

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología



Flavonoides del género Sideritis (Lamiaceae) por HPLC

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Olga María Palomino Ruiz-Poveda

Directores

Ángel María Villar del Fresno

M^a Emilia Carretero Accame

Madrid 2005

ISBN: 978-84-8466-903-6

© Olga María Palomino Ruiz-Poveda, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

*Flavonoides del Género Sideritis
(Lamiaceae) por HPLC*

Memoria que, para optar al grado
de Doctor en Farmacia, presenta
Olga M^a Palomino Ruiz-Poveda

Madrid, marzo 1995

D. Angel M^a Villar del Fresno, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y Dña M^a Emilia Carretero Accame, Profesor Titular de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "Flavonoides del Género *Sideritis* (*Lamiaceae*) por HPLC", realizada por la Licenciada en Farmacia Dña Olga M^a Palomino Ruiz-Poveda, ha sido llevada a cabo bajo nuestra inmediata dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Madrid, marzo 1995



Angel M^a Villar del Fresno



M^a Emilia Carretero Accame

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento,

A D. Angel M^a Villar del Fresno, por su dirección y sus constantes orientaciones y consejos durante la realización de esta Tesis Doctoral, así como por su interés tanto a nivel profesional como personal.

A M^a Emilia Carretero Accame, por su estímulo y apoyo constantes, así como por transmitirme su tesón en el trabajo cotidiano y su cariño por las plantas.

A la Dra Mónica Söllhuber Kretzer, por su interés y ayuda en la elucidación estructural de los compuestos aislados.

A la Dra Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado, por haberme brindado su ayuda, que considero inapreciable, y, sobre todo, su amistad, tan necesaria en algunos momentos del desarrollo de este trabajo.

A Carmen Ayuga Téllez y Karla Slowing Barillas, compañeras y amigas.

A todas las personas de este Departamento de Farmacología por su compañerismo, y en especial a Marta Zarandieta, y a la Dra Amparo Sánchez, por la experiencia compartida en la sala de HPLC.

A mis padres, por su ayuda y comprensión.

A Fernando, por su paciencia y el equilibrio que me ha infundido, y a mis hijos, Alonso y Cristina, de quienes espero que en un futuro comprendan y disculpen el tiempo que les he robado.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
II.1.- ESTUDIO BOTÁNICO	5
II.1.1.- Características del Género.	15
II.1.2.- Características de las especies.	16
II.2.- ESTUDIO FITOQUÍMICO	27
II.2.1.- Principios activos de naturaleza flavonoide.	27
II.2.2.- Compuestos de naturaleza terpénica y aceites esenciales.	32
II.3.- COMPUESTOS FLAVÓNICOS	36
II.3.1.- Generalidades. Estructura y propiedades generales. Reacciones de caracterización.	36
II.3.2.- Funciones e interés de los flavonoides.	44
II.3.3.- Extracción, aislamiento y purificación. Técnicas preparativas y analíticas.	55
II.3.3.1.- Cromatografía en papel.	60
II.3.3.2.- Cromatografía en capa fina.	61
II.3.3.3.- Cromatografía en columna.	63
II.3.3.4.- Cromatografía en contra-corriente de alta velocidad . . .	64
II.3.3.5.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	66
II.3.3.6.- Espectroscopía UV/VIS.	81
II.3.3.7.- Espectroscopía IR.	82
II.3.3.8.- Espectrofotometría de masas.	83

II.3.3.9.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	85
a) ^{13}C -RMN	85
b) ^1H -RMN	86
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	87
III.1.- MATERIAL VEGETAL	88
III.2.- METODOLOGÍA ANALÍTICA	91
III.2.1.- Extracción, aislamiento y purificación.	91
III.2.2.- Técnicas analíticas empleadas.	94
III.2.2.1.- CCF	94
III.2.2.2.- HPLC	95
III.2.2.3.- Espectroscopía UV/VIS	101
III.2.2.4.- Espectroscopía de RMN	101
IV.- RESULTADOS	102
IV.1.- Rendimiento de los extractos.	103
IV.2.- Cromatografía en capa fina.	105
IV.3.- Cromatografía Líquida de Alta Resolución	133
IV.3.1.- Patrones.	133
IV.3.2.- Extractos de <i>Sideritis</i>	138
IV.4.- Elucidación estructural de F1	191
IV.4.1.- CCF	191
IV.4.2.- Espectroscopía UV/VIS	191
IV.4.3.- Espectroscopía de RMN	193

V.- DISCUSIÓN	207
VI.- CONCLUSIONES	214
VII.- BIBLIOGRAFÍA	217

I.- INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El Género *Sideritis* (Lamiaceae) abarca más de 140 especies botánicas distribuidas por todo el litoral mediterráneo europeo y africano, incluyendo el archipiélago canario y las islas Madeira.

Varias especies del Género son empleadas en medicina popular en distintas regiones españolas, fundamentalmente en la zona de Levante y la provincia de Almería. Su nombre popular es el de "Rabo de gato", y su preparación en forma de infusión se administra como antiinflamatoria, digestiva, antimicrobiana y antiulcerosa.

Es un Género que abarca especies botánicas de difícil clasificación taxonómica debido al elevado número de hibridaciones que se producen entre ellas, lo que origina multitud de subespecies, variedades y formas. Su clasificación es tan problemática que muchas especies reciben dos o más nombres diferentes.

Esto ha hecho que muchos investigadores, además de atender a sus caracteres botánicos, procedan al análisis fitoquímico de las distintas especies para disponer de unos criterios más exactos para su clasificación botánica.

Desde el punto de vista farmacológico, el Género *Sideritis* presenta una marcada actividad, y así se han aislado compuestos de naturaleza terpenoide (borjatriol, andalusol, ent-cirsineol) y flavonoide (sideritoflavona, hypolaetina-8-O- β -D glucósido) con una importante acción antiinflamatoria.

Son, por tanto, los objetivos de este trabajo de investigación:

1. - Identificación y valoración de los principios activos de naturaleza flavonoide presentes en el mayor número posible de especies del Género *Sideritis* que crecen en España.
- 2.- Aislamiento de estos compuestos.
- 3.- Validación científica de la actividad atribuida a estas especies por el uso popular a través del conocimiento de la composición y riqueza de sus principios activos de naturaleza flavonoide.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.- ESTUDIO BOTÁNICO

División : *Spermatophyta*
Subdivisión : *Magnoliophytina*
Clase : *Dicotyledoneae* (= *Magnoliatae*)
Subclase : *Lamiidae*
Superorden : *Scrophularianae*
Orden : *Lamiales*
Familia : *Lamiaceae* (= *Labiatae*)
Género : *Sideritis*

Socorro y col., 1986b y Rivera y col., 1990 realizan una división del Género basada en caracteres morfológicos como la cubierta de pelo, citológicos como el número de cromosomas, y químicos, como la presencia de ciertos flavonoides y aceites esenciales, o bien sólo estos últimos. Así, el Género *Sideritis* se divide en seis secciones, cuatro de ellas perennes y dos formadas por plantas anuales:

Secciones perennes

Sección *Empedocleopsis*. Endémica de Macaronesia.

Sección *Marrubiastrum* (Moench) Benth. Endémica de Macaronesia.

Sección *Empedoclea* (Raf.) Benth. Se localiza en Italia, Balcanes, Islas Egeas, Turquía y Cercano Oriente.

Sección *Sideritis*. Endémica de la región mediterránea Occidental. Por el Norte llega hasta el Jura francés; por el Sur, hasta la cordillera del Atlas en Marruecos; por el Oeste abarca hasta el cabo de San Vicente en Portugal, y por el Este el Norte de Italia en Europa y el Norte de Túnez en Africa.

Secciones anuales

Sección *Burgsdorfia* (Moench) Briq. Incluye únicamente la especie *Sideritis romana* L., junto con sus dos variedades, *romana* y *lazae*.

Sección *Hesiodia* (Moench) Benth. Sólo encontramos la especie *Sideritis montana* L. ssp. *ebracteata*.

A su vez, la Sección *Sideritis* se divide en quince subsecciones (Rivera y col., 1990)

1. Subsec. *Grandiflora* Rivera & Obón, subsec. nov.

Especies: *S. grandiflora* Salzm. ex Benth.

Localización: Sureste España y Noreste Marruecos.

Flavonoides: 7 alosil (1→2) glucósidos de crisoeriol, luteolina y apigenina.
Flavonoides tipo floroglucinol sin sustitución en la posición 8.

2. Subsec. *Ovata* Rivera & Obón, subsec. nov.

Especies: *S. ovata* Cav.

S. borgiae Andrés en López Pacheco et al.

Localización: Montañas del noreste de España.

Flavonoides: Isoscutelareín-7-alosil glucósidos con trazas de hypolaetín-7-alosil (1→2) glucósido.

3. Subsec. *Camarae* Rivera & Obón, subsec. nov.

- Especies: *S. camarae* Sennen
 S. brachycalyx Pau.
 S. hyssopifolia var. *aranensis* F.Q.
 S. lurida Gay
 S. lurida var. *relegata* (F.Q.) F.Q. en F.Q. & Rothmaler
 S. scordioides var. *glabrata* Benth.

Localización: Centro y norte de España, sur de Francia, Pirineos, Cordillera Cantábrica, Picos de Europa, Gredos y provincia de Logroño.

4. Subsec. *Linearifolia* Rivera & Obón, subsec. nov.

- Especies: *S. linearifolia* Lam.
 S. alpina Villars
 S. brevispica Sennen & Elias
 S. carbonellis Socorro
 S. cantabrica Sennen & Elias
 S. castellana Sennen & Elias
 S. cynensis Sennen
 S. gyeimensis F.Q.
 S. hyssopifolia L.
 S. hyssopifolia ssp. *guillonii* (Timb.-Lagr.)
 S. javalambrensis Pau.
 S. maura De Naë en Bal
 S. pastoris Sennen
 S. peyrei Timb.-Lagr.
 S. pyrenaica Poirét
 S. scordioides var. *angustifolia* Benth.
 S. scordioides var. *elongata* Benth.
 S. vidali Sennen

Localización: Norte de Africa, sudeste de España, base del Ebro, montañas de Castilla, norte de España, Pirineos, este de Francia, noreste de Italia.

Flavonoides: Cirsilineol, 8-MeO cirsilineol, xantomicrool, derivados de isoscutelareina o hypolaetina.

5. Subsec. *Gymnocarpae* Rivera & Obón, subsec. nov.

- Especies: *S. incana* L.
S. incana var. *albiflora* Maire en Battand
S. incana var. *albiflora* subvar. *roseiflora* F.Q.
S. incana var. *albiflora* subvar. *depauperata* F.Q.
S. incana var. *altiatlantica* F.Q.
S. incana var. *altiatlantica* subvar. *recessa* F.Q.
S. incana var. *angustifolia* F.Q.
S. incana var. *aurasiaca* Battand
S. incana var. *edetana* Pau ex F.Q.
S. incana var. *edetana* subvar. *saxifraga* F.Q.
S. incana var. *flavovirens* Maire
S. incana var. *virgata* subvar. *arairae* (Maire) F.Q.
S. incana var. *longifolia* F.Q.
S. incana var. *occidentalis* F.Q.
S. incana var. *viridifolia* C. Vicioso
S. incana var. *regimontana* Maire
S. incana var. *robusta* F.Q.
S. incana var. *socovenssis* Rivera & Obón
S. incana var. *tomentosa* Battand & Pittard
S. incana subvar. *spinulosa* F.Q.
S. incana ssp. *tunetana* Murb.
S. atlantica Pomel
S. atlantica var. *nervosa* Pomel
S. glauca Cav.

S. guyoniana Boiss. & Reut.
S. matris-filiae Emb. & Maire
S. ochroleuca auct. non Willk.
S. pycnostachys Pomel ex Battand. & Trabut
S. sericea Pers.
S. virgata Desf.

Localización: España, Marruecos, Argelia y Túnez.

Flavonoides: Vacuolares del grupo de la hypolaetina.

6. Subsec. *Stachydioides* Rivera & Obón, subsec. nov.

Especies: *S. stachydioides* Willk.

Localización: En montañas en una zona muy reducida del sudeste español.

Flavonoides: Trazas de flavonoides vacuolares, derivados de luteolina y apigenina, así como de hypolaetina.

7. Subsec. *Lacaitae* Rivera & Obón, subsec. nov.

Especies: *S. lacitae* F.Q.

Localización: Norte de Andalucía y sur de Castilla.

Flavonoides: Vacuolares, derivados de hypolaetina.

8. Subsec. *Hirsuta* Rivera & Obón, subsec. nov.

Especies: *S. hirsuta* L.
S. hirsuta var. *altilabra* Pau. en Sched.
S. hirsuta var. *bracteosa* Willk.

S. hirsuta var. *granatensis* Pau.
S. hirsuta var. *maroccana* Cosson en Battand
S. hirsuta var. *nivalis* F.Q.
S. hirsuta var. *maritima* subvar. *angustifolia* F.Q.
S. hirsuta ssp. *emporitana* Cadev. en Cadev. & F.Q.
S. provincialis Jordan & Fourr, en Sched. *S. ruscinonensis*
 Timb.-Lagr.
S. tomentosa Pourret
S. hirtula Brot.
S. imbricata H. Lindb.
S. kebdanensis Sennen
S. littoralis Timb.-Lagr.
S. aculeata (Bubani) F.Q.
S. agustinii Sennen & Pau
S. briquetiana F.Q.
S. bubanii F.Q.
S. catalaunica Sennen & Pau.
S. crenata Lapeyr.
S. endresii Willk.
S. endresii f. *laxispicata* Degen & Debeaux
S. gaditana Rouy
S. gouani Timb.-Lagr.

Localización: Portugal, España, sur de Francia, norte de Italia, Marruecos, Argelia.

Flavonoides: Cirsiliol, 8-MeO cirsiliol, sideritoflavona, xantomicrool, isoscutelareina e hypolaetina y sus derivados.

9. Subsec. *Chamaedryfolia* Rivera & Obón, subsec. nov.

Especies: *S. chamaedryfolia* Cav.

S. fontii Sennen

Localización: Sureste de España y sur de Cataluña.

10. Subsec. *Arborescens* Rivera & Obón, subsec. nov.

Especies: *S. arborescens* Salzm. ex Benth.

S. angustifolia var. *lusitanica* F.Q.

S. arborescens var. *africana* F.Q. Pau. en F.Q.

S. arborescens var. *kebdanensis* f. *laxispica* F.Q. & Sennen en Sennen

S. arborescens var. *ortonedae* F.Q. & Pau

S. arborescens ssp. *perez-larae* Borja

S. foetens Clem. ex Lag.

S. foetens var. *rivas-godayi* Fernández Casas

S. getula Battand.

S. luteola F.Q.

S. maireana F.Q. & Pau. en F.Q.

S. paulii Pau.

S. paulii var. *castellana* F.Q. & Pau.

S. subatlantica Battand.

S. subatlantica f. *heterostachya* Sen.

S. subatlantica f. *laxispica* Pau. & F.Q. en F.Q.

S. subatlantica var. *riphaea* F.Q. & Pau. en F.Q.

Localización: Sur de la Península Ibérica y Marruecos.

Flavonoides: Derivados de hypolaetina o isoscutelareina.

11. Subsec. *Flavovirens* Rivera & Obón, subsec. nov.

- Especies: *S. leucantha* var. *flavovirens* Rouy
S. leucantha var. *carthaginensis* F.Q.
S. leucantha var. *microphylla* Willk.
S. almeriensis Pau.
S. debeauxii F.Q.
S. hirsuta var. *maritima* F.Q.
S. hirsuta var. *maritima* subvar. *rotundifolia*, l.c.
S. hirsuta var. *maritima* subvar. *pinnatifida* F.Q., l.c.
S. hirsuta var. *maritima* subvar. *oscilans* F.Q., l.c. *S. ibanyezii*
S. ilorcitana Sennen
S. ochroleuca Willk.
S. ochroleuca var. *antiatlantica* Maire
S. ochroleuca var. *brevibracteata* F.Q.
S. ochroleuca var. *denticulata* F.Q.
S. ochroleuca var. *eremophylla* (Maire) F.Q.
S. ochroleuca var. *mairei* F.Q.
S. ochroleuca var. *maroccana* F.Q.
S. osteoxylla Pau.
S. pusilla (Lge.) Pau.
S. pusilla var. *carthaginensis* F.Q.
S. pusilla var. *gracillima* F.Q.
S. pusilla var. *littoralis* F.Q.
S. pusilla var. *salina* F.Q.

Localización: Sudeste de España y norte de Marruecos.

Flavonoides: Cirsiliol, 8-MeO cirsiliol, sideritoflavona, cirsimaritina, xantomierol e isoscutelareina e hypolaetina y derivados.

12. Subsec. *Leucantha* Rivera & Obón, subsec. nov.

- Especies: *S. leucantha* Cav.
 S. leucantha var. *incana* (Willk.) F.Q.
 S. leucantha var. *integrifolia* Cosson en Sched., l.c.
 S. leucantha var. *intermedia* F.Q.
 S. leucantha var. *meridionalis* F.Q.
 S. leucantha var. *oblongifolia* Rouy
 S. leucantha var. *paucidentata* Willk.
 S. leucantha var. *serratifolia* Willk.
 S. biflora Porta et Rigo
 S. bourgeana Boiss. & Reut.
 S. tragoriganum Lag.

Localización: Sudeste de España.

Flavonoides: Cirsiliol, cirsilineol, 8-MeO cirsilineol, sideritoflavona, xantomicrool e hypolaetina e isoscutelareina y derivados.

13. Subsec. *Angustifolia* Rivera & Obón, subsec. nov.

- Especies: *S. angustifolia* Lag.
 S. funkiana Willk.
 S. jahandiezii F.Q.
 S. lagascana Willk.
 S. mugronensis Borja
 S. reverchonii Willk.
 S. saetabensis Rouy

Localización: Sur y este de España. Diversidad en el borde este de la meseta, área de Guadix-Baza con un centro secundario en Málaga. Una especie en el norte de África.

Flavonoides: Sideritoflavona, cirsiol, 8-MeO cirsiol, cirsimarina, cirsilinol, xantomicrol e hypolaetina e isoscutelareina y derivados.

14. Subsec. *Serrata* Rivera & Obón, subsec. nov.

Especies: *S. serrata* Lag.
S. fragans Costa ex Rouy
S. ilicifolia Wild.

Localización: Este de España en la zona de Cataluña. Una localidad aislada en la provincia de Albacete.

Flavonoides: Cirsiol, sideritoflavona, cirsimarina, xantomicrol, cirsilinol, 8-MeO cirsilinol, 5-desmetil nobiletina, gardenina B e hypolaetina e isoscutelareina y derivados.

15. Subsec. *Scordioides* Rivera & Obón, subsec. nov.

Especies: *S. scordioides* L.
S. cavanillesii Lag.
S. crispata Willd.
S. glacialis var. *pulvinata* F.Q. en sched.
S. mariae Sennen
S. spinosa Lam.
S. spinulosa Barnades ex Asso
S. spinulosa f. *intermedia* F.Q.
S. subspinosa Cav.

Localización: Norte de España y sur de Francia. Centro de diversidad alrededor del Ebro (basin) y sur de los Pirineos. Localidad aislada en Sierra Nevada.

Flavonoides: Siderito flavona, cirsimarina, cirsilina, xantomicro y hypolaetina e isoscutelareína y derivados.

II.1.1.- Características del Género

El nombre del Género *Sideritis* proviene etimológicamente del griego sideros, hierro, por la terminación dura de los dientes del cáliz. El Dr. Font Quer, 1962, indica la posibilidad de que este nombre provenga del dado por los griegos a todas las plantas vulnerarias capaces de curar heridas producidas por armas férreas, en griego *sideros*, por lo que vino a identificarse el arma que produce la herida con el remedio.

Aparece en matas leñosas, sufruticosas, vivaces y más raramente herbáceas, anuales; inodoras, aromáticas o malolientes; glabras o más o menos cubiertas de pelos tectores, glandulares o eglandulares. Hojas caulinares enteras, crenadas, lobuladas o dentadas, de lineares a ovadas o espatuladas, sentadas o con lámina atenuada en peciolo. Brácteas oval-trianguulares, semicirculares o cordadas, con los márgenes más o menos regularmente dentados y en ocasiones con la parte central en forma de diente sobresaliente espiniscente; bracteolas ausentes. Flores agrupadas en verticilastros formando espigas laxas o en algunas ocasiones densas, con 6 flores, por lo general sentadas o sobre cortos pedicelos, raramente bi- trifloros. Cáliz tubuloso-campanulado, con 5 dientes espinosos o subespinosos, iguales, subiguales o el superior mayor, con 10 nervios y frecuentemente tomentoso, hirsuto y glanduloso; la existencia de un anillo continuo de pelos en su garganta (carpostegio) es de suma importancia en la botánica sistemática de estas plantas. Corola blanca, amarillenta o con ambos colores a la vez, rosada o púrpura, con tubo más corto, igual o ligeramente mayor que el cáliz, bilabiada, con labio superior patente, plano o subplano, entero o por lo general escotado en su extremo, bilobulado; el labiolo trilobo, con lóbulo central mayor y de margen entero o ligeramente escotado. 4 estambres didínamos, incluidos en el tubo de la corola, siendo las anteras de los superiores con dos celdas opuestas y dehiscentes. Estilo incluso, con ramas subiguales. Núcúlas redondeadas en su ápice.

Existen numerosas especies, leñosas en su mayoría, extendidas por toda España caliza en montes y colinas, fundamentalmente en el este y sur de la Península.

II.1.2.- Características de las especies

A continuación se recogen las características de las especies del Género *Sideritis* que serán objeto de nuestro estudio:

1) *Sideritis foetens* Clem. ex Lag.= *Sideritis lasiantha* auct.

Arbusto algo "fétido" de 1m, tallos erectos herbáceos, glabrescentes. Hojas 20 x 1,5 mm, lineares, enteras. Verticilastros unidos en densas espigas. Brácteas inferiores 6-8 x 6-10 mm; el cáliz normalmente 6 mm, con anillo de pelos dentro; corola 6 mm, blanca, con líneas rojas en los labios. $2n = 30$

Su nombre vulgar es el de "gusanera".

Floración: Abril-junio

Area geográfica: Endemismo de la provincia corológica Murciano-Almeriense con escasa representación en el sur de Murcia (Sierra de Almenara, Sierra de Canta...) y abundante en Almería sobre calizas calco-dolomíticas y margas alpujárrides de los pisos bioclimáticos termo y mesomediterráneo inferior, en las sierras de Gádor, Nevada caliza, Alhamilla y con presencia en Cabo de Gata.

2) *Sideritis luteola* F.Q.= *Sideritis arborescens* Salzm. ex Benth. ssp. *luteola* (F.Q.) P.W. Ball & Heywood

Arbusto hasta 1m, erecto. Hojas 15-35 x 1-10 mm, linear-lanceoladas, dentadas. Verticilastros 4-20, distantes, 6-10 flores; 8-15 x 8-20 mm, iguales al cáliz; éste 7-9 mm, glanduloso con un círculo de pelos dentro. Corola 8-13 mm, amarillo o rosa pálido.

Floración: Mayo-junio

Area geográfica: Endemismo almeriense.

3) *Sideritis almeriensis* Pau.

Esta especie es considerada como sinónimo de *Sideritis pusilla* (Lge.) Pau. ssp. *almeriensis*, por lo cual sus características botánicas se recogen en el punto correspondiente a esta última. No obstante, dado que ambas se han clasificado de forma distinta, decidimos estudiarlas fitoquímicamente por separado y comprobar así si realmente se trata de la misma especie.

4) *Sideritis hirsuta* L. = *Sideritis tomentosa* Pourret = *Sideritis hirsuta* Brot.

Planta de 50 cm, "hirsuta". Hojas 10-20 x 4-10mm, oval-oblongas, dentadas, verde-grisáceas. Verticilastros 4-15, normalmente con 6 flores, brácteas 6-15 x 8-20 mm, iguales o menores que el cáliz, dentadas. Cáliz campanulado de 5-8 mm, hirsuto- glanduloso con dientes subiguales, triangulares, aristados, entre 1/2 a igual longitud que el tubo con un anillo de pelos dentro. Corola 8-10 mm, de garganta ligeramente mayor que el cáliz, labio superior blanco o amarillo pálido de extremo plano o bilobulado con lóbulos obtusos; el inferior amarillo, raro blanco, con el lóbulo central redondeado y sin escotadura. $2n=28$.

Floración: Junio-agosto

Area geográfica: Costas mediterráneas occidentales de Europa.

5) *Sideritis leucantha* Cav. var. *serratifolia* Willk. = *Sideritis leucantha* var. *oblongifolia* Rouy

Planta bastante conflictiva muy próxima a la "grex" *pusilla*. La unidad de estudio, su hábito, época de floración, ecología y algunos caracteres morfológicos hacen que se incluya en el grupo *leucantha*, aunque se considera perfectamente diferenciable de la ssp.

leucantha, por lo que se recoge como variedad.

Planta de hábito verde-grisáceo, con tallos erectos, de hasta 50 cm, extremadamente tomentosos. Hojas basilares pequeñas de lámina oval-oblongas con entrenudos muy cortos, lo que forma un conjunto denso, tomentoso-glandulosas, con los bordes regularmente dentados en 4-6 pares de dientes obtusos y aristados, atenuadas en un ancho peciolo; las anuales de los tallos floríferos claramente mayores y más distanciadas. Verticilastros numerosos pero próximos. Brácteas suborbiculares, dentadas en todo su entorno con los dientes de base ancha y larga arista, pelosas y menores que los cálices. Cáliz peloso, campanulado de hasta 9 mm, con dientes subiguales. Corola de tubo incluso en el cáliz en su totalidad, de un blanco sucio.

Floración: Mayo-junio

Area geográfica: Endemismo del Levante y Sureste peninsular.

6) *Sideritis biflora* Porta et Rigo = *Sideritis leucantha* Cav. var. *bourgeana*

Esta especie es considerada como sinónimo de *Sideritis bourgeana* Boiss. et Reut.. Sin embargo, al ser recolectadas fueron clasificadas con nombres distintos, por lo que decidimos analizarlas por separado para comprobar si realmente son la misma especie.

7) *Sideritis leucantha* Cav. ssp. *incana* var. *meridionalis*

No hemos encontrado ninguna referencia botánica sobre esta especie.

8) *Sideritis bourgeana* Boiss. et Reut. = *Sideritis leucantha* Cav. ssp. *bourgeana* (Boiss. et Reut.) Rivas-God. et Rivas-Martínez = *Sideritis biflora* Porta et Rigo = *Sideritis leucantha* var. *bourgeana* (Boiss. et Reut.) F.Q. = *Sideritis leucantha* Cav. var. *paucidentata* Willk.

Planta con pocos tallos floríferos anuales, lo que proporciona un hábito de aspecto grácil, algo decumbentes, endebles, albo-tomentosos. Hojas estrechas, enteras o con algún lóbulo incipiente, agudas, glandulosas, mucronadas, lo que junto a su rigidez las torna algo punzantes. Verticilastros distantes, pequeños, con 2-3 flores aunque lo general son 2. Brácteas pequeñas con diente central de contorno triangular, prominente y agudo y 3-5 pares de dientes laterales. Cáliz campanulado, peloso-glandular, con dientes algo curvados hacia su interior, ligeramente mayores que las brácteas. Corola de labio superior mayor, profundamente bilobulado; el inferior con lóbulo central prominente de contorno redondeado y los laterales algo curvados hacia el interior. $2n=26$

Floración: Mayo-junio

Area geográfica: Endemismo de las provincias de Albacete, Alicante, Almería y Murcia.

9) *Sideritis pusilla* (Lge) Pau. ssp. *almeriensis* (Pau) H.T. Malagarriga = *Sideritis almeriensis* Pau. = *Sideritis pusilla* (Lge) Pau. var. *almeriensis* (Pau.) F.Q. = *Sideritis hirsuta* L. var. *almeriensis* Pau.

Planta de hábito caulescente, intrincado-leñoso en su base, de pequeños troncos tortuosos y blanquecinos. Tallos anuales finos, erectos, blanquecino-verdosos, de hasta 50 cm de altura con pelos cortos, ganchudos y retrorsos en su zona foliar, tomentoso-hirsutos en la inflorescencia con pelos salientes, crispados, de hasta 1,5 mm, de extremidad vitiforme. Hojas lanceoladas u oval-lanceoladas de 8-12 x 3-5 mm, glabras o subglabras, glandulosas, de toscamente crenadas a regularmente dentadas, con 3-6 lóbulos obtusos, míticos por margen y el central mucronado; uninervadas, con el nervio principal ramificado en su parte extrema. Verticilastros distantes con 6 flores. Brácteas ovales o reniformes, peloso-glandulares de 3-6 x 6-8 mm, dentadas en todo su entorno, con dientes subiguales, ciliados y aristados. Cáliz campanulado, glandular-peloso, de 6-7 mm, con los dientes subiguales, triangulares y de extremidad aristada, hialina. Corolas blancas aunque son frecuentes al final de la antesis los ejemplares con tubo y labio inferior amarillentos; labio superior de extremidad entera, con ligera muesca o profundamente bilobulado y el inferior menor, con el lóbulo central

redondeado y laterales obtusos y ligeramente acuminados.

Floración: Enero-abril

Area geográfica: Endemismo almeriense sobre margas y calco-dolomías de los pies de monte de las sierras de Gádor y Alhamilla.

10) *Sideritis ibanyezii* Pau. = *Sideritis flavovirens* (Rouy) Rivas-God.&

Gómez-García = *Sideritis ilorcitani* Sennen =

Sideritis pusilla (Lge) Pau. ssp. *flavovirens*

(Rouy) H.T. Malagarriga = *Sideritis leucantha*

Cav. var. *flavovirens* Rouy = *Sideritis pusilla*

(Lge) Pau. var. *flavovirens* (Rouy) F.Q.

Planta sufruticosa de hábito caméfito-intrincado; tallos floríferos anuales de hasta 60 cm, erectos, gráciles, de tonalidad verde-amarillenta, variable desde el inicio al final de la antesis, más o menos glanduloso-viscosos; entrenudos foliares con pelos cortos, incurvados hacia la base, aplicados; los floríferos con este mismo tipo entremezclados con otros más largos (de 0,5 a 0,7 mm) patentes o algo retrorsos como los cortos. Hojas linear-lanceoladas de 7-20 x 1-5 mm, uninervadas, con nervio central ramificado en 3-5 ramas hacia los lóbulos marginales o bien con la parte distal espatulada y atenuada en un largo peciolo ciliado en su base, glandulosas, crenado-dentadas con 3-5 lóbulos obtusos por margen en su parte distal y el central mucronado. Verticilastros distantes 5-10 con 6 flores. Brácteas semiorbiculares de base cordada, peloso-glandulares, de hasta 7-10 mm, más cortas que los cálices, inciso-dentadas en todo su entorno, con hasta 12 dientes por margen, subiguales, ciliado-aristados. Cáliz 5-8 mm, campanulado, hirsuto-glanduloso, con dientes de ancha base, triangular-aristados. Corola 7-9 mm, amarillenta, con tubo glabro y claramente sobresaliente del cáliz; labios de dorso pubescente, el superior erecto-patente, de hasta 5 mm, de extremo desde ligera a profundamente escotado, con lóbulos agudos y el labio menor trilobulado con el lóbulo medio de margen redondeado, algo curvado y ligeramente escotado. Núcúlas de 2 x 1,7 mm, ovales. $2n=32$

Floración: Muy dilatada: Enero a junio (Vélez Rubio)

Distribución geográfica: Endemismo del sector lorquino-verense, sector almeriense, provincia corológica murciano-almeriense.

11) *Sideritis pusilla* ssp. *pusilla* var. *granatensis* = *Sideritis pusilla* var.
granatensis = *Sideritis granatensis* = *Sideritis*
hirsuta var. *granatensis*

El Dr. Pau, 1916, pone de manifiesto su semejanza con la variedad *almeriensis*, si bien con los tallos más robustos y afelpados hasta la base. Por sus hojas más anchas, regularmente dentadas o crenadas de lóbulos agudos, aristados. Verticilastros mayores y más próximos que en la variedad *almeriensis*, lo que da a la inflorescencia un aspecto más denso. Corolas blancas con el labio superior entero o muy someramente escotado.

Floración: Febrero-mayo

Area geográfica: Endemismo de las sierras calizas próximas al litoral de las provincias de Almería, Granada y Málaga.

12) *Sideritis leucantha* Cav. var. *incana* (Wk.) F.Q.= *Sideritis incana* L.
= *Sideritis linearifolia* Wk. var. *incana* Wk.=
Sideritis leucantha Cav. var. *paucidentata* Willk.
= *Sideritis leucantha* Cav. var. *integrifolia* Coss.

Planta tomentosa, "blanca", de 30-60 cm, perenne. Hojas 15-40 x 2-4 mm, lineares, oval lanceoladas o espatuladas, enteras o con algunos dientes pequeños. Verticilastros distantes, pequeños y numerosos en los que destacan las brácteas punzantes al final de la antesis; con 6 flores. Brácteas inferiores 3-10 x 2-8 mm, más cortas que el cáliz; éste es campanulado, de 4-8 mm, peloso-glandular con los dientes triangulares de un tercio de la longitud del tubo, aristados. La corola 8-10 mm, poco saliente, con labio superior blanco y bilobulado; el inferior con lóbulos laterales agudos y el central, redondeado, de color citrino.

bilobulado; el inferior con lóbulos laterales agudos y el central, redondeado, de color citrino. $2n=26$.

Floración: Abril-julio

Area geográfica: Endemismo de las provincias de Granada y Almería sobre terrenos altos de la provincia corológica Castellano-Maestrazgo-Manchega que comprende el noroeste granadino y el norte almeriense.

13) *Sideritis cillensis*

No hemos encontrado ninguna referencia botánica sobre esta especie.

14) *Sideritis pusilla* (Lange) Pau.

Para algunos autores es un taxón no admitido con la categoría de especie (Heywood, 1981), aunque sí debe ser considerado como tal, ya que es perfectamente diferenciable de *S. leucantha* Cav. y *S. hirsuta* L. (especies entre las que se considera intermedia) tanto por su hábito como por la forma de los tallos, pelosidad, hojas, brácteas y corolas.

S. pusilla es una planta más evolucionada que las anteriores. Su aspecto extremadamente leñoso, troncos redondeados en su mayoría, hojas y brácteas pequeñas y dentadas, floración muy temprana, etc, son adaptaciones a climas áridos y suelos empobrecidos. La existencia de sustancias repelentes es una adaptación desde el Mioceno-Oligoceno orientada hacia una lucha por la supervivencia en la evolución conjunta del sistema planta-herbívoro.

Es característica la presencia en la inflorescencia de pelos largos más o menos salientes en mezcla con otros cortos aplicados.

Camefito sufrutescente con tallos anuales de hasta 65 cm, tomentoso-hirsutos en la inflorescencia. Hojas ovales, espatuladas o lanceoladas, lobuladas. Brácteas subcirculares

o reniformes, aserradas en todo su entorno. Corolas blanquecinas o amarillentas. Plantas del sector almeriense.

Es bastante común en las provincias de Almería, Granada y Málaga. De ella se han citado nueve variedades.

Area geográfica: Endemismo del sureste español.

15) *Sideritis glauca* Cav.

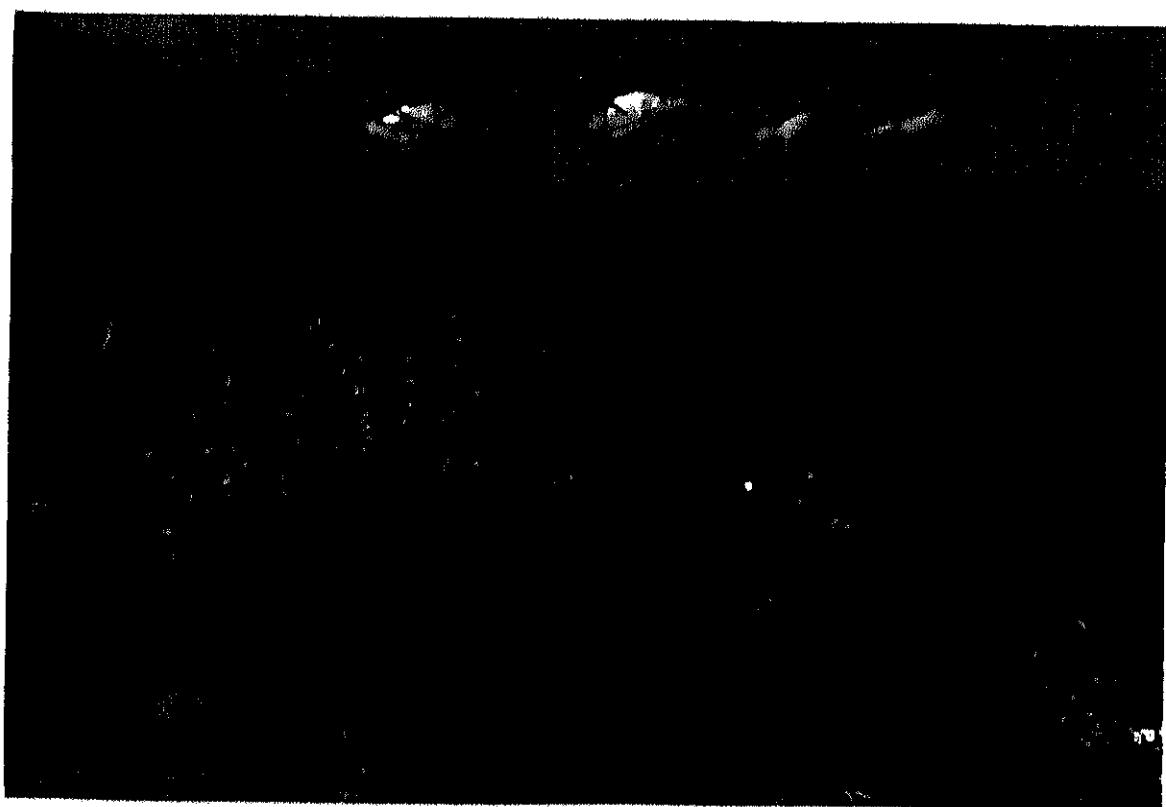
No hemos encontrado ninguna referencia botánica sobre esta especie.

16) *Sideritis incana* L. ssp. *incana*

No hemos encontrado ninguna referencia botánica sobre esta especie.



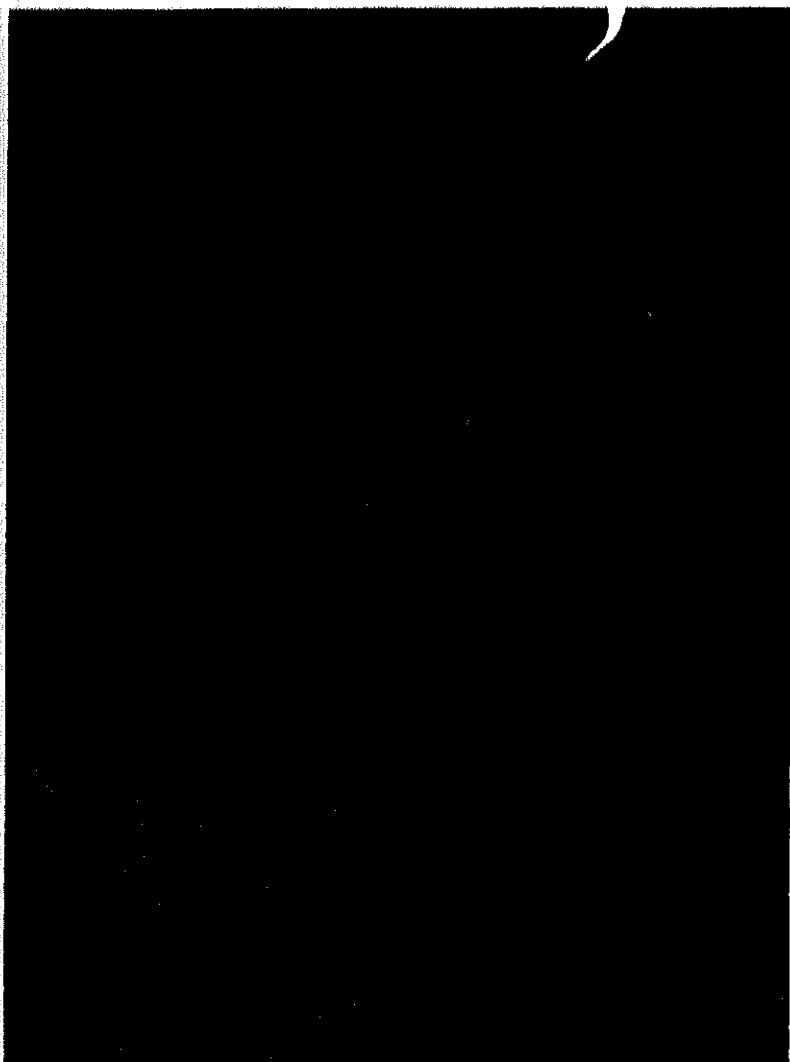
Sideritis foetens Clem. ex Lag.



Sideritis pusilla ssp. *almeriensis* Pau



Sideritis ibanyezii Pau.



Sideritis pusilla ssp *pusilla*

var *granatensis*



Sideritis biflora Porta et Rigo



Sideritis leucantha Cav. ssp *incana* var *meridionalis*

II.2.- ESTUDIO FITOQUÍMICO

El estudio fitoquímico de numerosas especies del Género *Sideritis* ha puesto de manifiesto que este Género carece de algunos principios activos como son los alcaloides, antraquinonas, taninos gálicos y cumarinas volátiles; además, es escaso o nulo su contenido en resinas y lactonas.

Los principios activos más abundantes son los flavonoides; también es importante su contenido en taninos catéquicos y terpenos, y menos, el de aceites esenciales y saponósidos (Villar y col., 1984f).

II.2.1.- Principios activos de naturaleza flavonoide

Los flavonoides más frecuentes en la familia Lamiaceae son las flavonas, flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles (\equiv flavanonoles).

Dentro de esta familia, los sustituyentes más comunes en los distintos carbonos son los siguientes:

C₁ - OH, OMe

C₄ - OH

C₆ - OH, O sustituido

C₇ - OH, O sustituido, muy frecuentemente por azúcares

C₈ - sustitución frecuente; muy característicos los 8-metoxi derivados

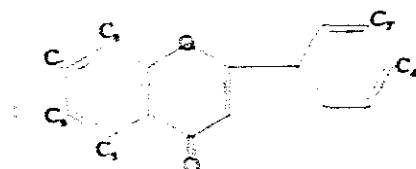
C₂ - O- sustitución, fundamentalmente metoxilo.

C_{4'} - sin 4'-O- sustituyentes en el 40-50 % de los flavonoles

C₆ - O- sustitución

Dado que el estudio de los compuestos flavónicos del Género *Sideritis* es el objeto de esta Tesis Doctoral, estos se abordarán en profundidad en un capítulo aparte; a continuación se recogen los flavonoides aislados a partir de distintas especies de este Género por diversos autores:

FLAVONOIDES



FLAVONOIDE	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
<i>Flavonas hidroxiladas</i>						
1.-Apigenina	OH		OH			OH
2.-Luteolina	OH		OH		OH	OH
<i>Glucósidos de flavonas hidroxiladas</i>						
3.-Isoscutelareín-7-O-glucósido	OH		O-Glucosa	OH		OH
4.-Hypolaetina-8-glucósido	OH		OH	O-Glucosa	OH	OH
5.-8-hidroxiluteolina 7-O-glucósido	OH		O-Glucosa	OH	OH	OH
<i>Flavonas metoxiladas</i>						
6.-Crisoeriol	OH		OH		OCH ₃	OH
7.-8-hidroxicrisoeriol	OH		OH	OH	OCH ₃	OH
8.-Cirsimaritina	OH	OCH ₃	OCH ₃			OH
9.-5,4'-dihidroxi6,7-dimetoxiflavona	OH	OCH ₃	OCH ₃			OH
10.-5,3',4'-trihidroxi6,7-dimetoxiflavona	OH	OCH ₃	OCH ₃		OH	OH

FLAVONOIDE	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁
11.- Cirsilineol	OH	OCH ₃	OCH ₃		OH	OH
12.- Salvigenina	OH	OCH ₃	OCH ₃			OCH ₃
13.- Xantomicrol	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		OH
14.- Sideritoflavona	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
15.- Cirsilineol	OH	OCH ₃	OCH ₃		OCH ₃	OH
16.- 5,4'-dihidroxi 6,7,8-trimetoxiflavona	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		OH
17.- 5,4'-dihidroxi 6,7,3'-trimetoxiflavona	OH	OCH ₃	OCH ₃		OCH ₃	OH
18.- 5,3',4'-trihidroxi 6,7,8-trimetoxiflavona	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
19.- Gardenina B	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		OCH ₃
20.- 5-hidroxi 6,7,3',4'-tetrametoxiflavona	OH	OCH ₃	OCH ₃		OCH ₃	OCH ₃
21.- Gardenina D	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
22.- 8-metoxicirsilineol	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
23.- 5-demetilnobiletina	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
<i>Glucósidos de flavonas metoxiladas</i>						
24.- Leucantina	OH	OH	diglucosa		OCH ₃	OH
25.- 5,7,3',4'-tetrahidroxi 6,8-dimetoxiflavona 7-glucósido	OH	OCH ₃	O-glucosa	OCH ₃	OH	OH
26.- 5,8,3',4'-tetrahidroxi 6,7-dimetoxiflavona 8-glucósido	OH	OCH ₃	OCH ₃	O-glucosa	OH	OH
27.- 5,7,4'-trihidroxi-6,8,3'-trimetoxiflavona 7-glucósido	OH	OCH ₃	O-glucosa	OCH ₃	OCH ₃	OH

FLAVONOIDE

ESPECIE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16- 18	21	22	24- 27
<i>S. angustifolia</i>				+				+			-	+	+	+			+	
<i>S. arborescens</i>				+		+		+			+	+	+	+			+	
<i>S. arborescens ssp. paulii</i>				+									+					
<i>S. flavovirens</i>				+							+	+	-	+			+	
<i>S. foetens</i>				+									+					
<i>S. funkiana</i>												-	-				+	
<i>S. glacialis</i>				+									+					
<i>S. glauca</i>	+	+		+		+		+			+	+	+				+	
<i>S. granatensis</i>	+	+		+		+		+			+	+	+	+			+	
<i>S. hirsuta</i>	+	+		+		+		+			+	+	+	+			+	
<i>S. hirsuta ssp. hirsuta</i>													+					
<i>S. hirsuta ssp. iberica</i>				+									+					
<i>S. hirsuta var. laxespica</i>				+									+					
<i>S. hyssopifolia</i>				+														
<i>S. incana</i>		+				+						+	+					
<i>S. incana ssp. incana</i>	+			+				+			+			+			+	
<i>S. incana ssp. sericea</i>				+														
<i>S. incana var. intermedia</i>				+														
<i>S. javalambrensis</i>												+				+		
<i>S. leucantha</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>S. leucantha ssp. leucantha</i>				+									+					
<i>S. leucantha var. bourgeana</i>				+									+					
<i>S. leucantha var. incana</i>				+									+					

FLAVONOIDE

ESPECIE	1	2	4	6	7	8	11	12	13	14	15	19	20	21	22	23
<i>S. linearifolia</i>			+							+						
<i>S. montana</i> ssp. <i>ebracteata</i>	+	+		+		+	+		+	+	+				+	
<i>S. mugronensis</i>	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. osteoxyla</i>			+							+						
<i>S. pusilla</i>	+	+	+	+		+	+		+	+	+				+	
<i>S. pusilla</i> ssp. <i>cartaginensis</i>	+	+		+		+	+		+	+	+				+	
<i>S. reverchonii</i>			+							+						
<i>S. serrata</i>			+					+		+		+		+		
<i>S. scordioides</i> ssp. <i>scordioides</i>	+	+		+		+	+		+	+	+				+	
<i>S. scordioides</i> ssp. <i>cavanillesii</i>			+							+						
<i>S. spinulosa</i>	+	+	+	+		+	+		+	+	+				+	
<i>S. tragoriganum</i> ssp. <i>tragoriganum</i>	+		+						+	+					+	
<i>S. tragoriganum</i> ssp. <i>nova</i>	+								+	+					+	
<i>S. tragoriganum</i> x <i>S. leucantha</i>	+	+		+		+	+		+	+	+				+	

De acuerdo con los resultados obtenidos por Villar y col., 1985c, se encontró un esquema común de distribución de las metoxiflavonas en un buen número de especies estudiadas: *S. angustifolia* y las especies próximas *S. funkiana* y *S. tragoriganum*, y, por otra parte, *S. leucantha*. Las diferencias entre ellas son sólo cuantitativas. *S. tragoriganum nova* se distingue de *S. tragoriganum tragoriganum* por tener 8-metoxicirsilineol.

S. incana y *S. scordioides* se diferencian de las otras especies por la ausencia de flavonas libres. *S. javalambrensis* se encuentra en posición intermedia con respecto a su contenido en flavonas, y carece de siderito flavona, la genina más característica del género.

S. mugronensis se distingue por la riqueza en metoxiflavonas en el extracto hexánico y en ausencia en el extracto clorofórmico debido a la mayor lipofilia de las flavonas presentes; es mayoritaria la 5-desmetilnobiletina.

11.2.2.- Compuestos de naturaleza terpénica y aceites esenciales

Terpenos

La mayoría de los terpenos aislados del Género *Sideritis* pertenecen al grupo de los no volátiles (diterpenoides).

Andalusol, siderol, eubol y riberol fueron aislados a partir de especies de este Género, así como el borjatriol (Villar, 1991; Villar y col., 1984a; Barberán y col., 1987; Rodríguez y col., 1973; López-Parriego, 1991); este último se obtuvo en primer lugar a partir de *Sideritis mugronensis* Borja y *Sideritis pusilla* ssp. *flavovirens*, demostrando poseer actividad sobre modelos experimentales de inflamación aguda sin efectos irritantes gástricos (Rodríguez y col., 1973; Villar y col., 1983; Villar y col., 1984a y 1984b).

Díaz y col., 1988 realizaron un estudio sobre agentes antimicrobianos aislados a partir de especies de *Sideritis* españolas, como resultado del cual se obtuvieron una serie de diterpenoides activos frente a bacterias G+ (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*,

Mycobacterium phlei) y, en algunos casos, también frente a levaduras (*Candida albicans*). Se observó que el grupo 1,3 diol es el responsable de esta actividad; otro grupo hidroxilo en la molécula produce una disminución drástica en la actividad antimicrobiana. Por otro lado, un grupo acetoxilo incrementa la actividad inhibitoria. El 1-acetiljativatriol es el primer diterpenoide natural *ent*-beyerénico con actividad antimicrobiana, aunque su potencia es insuficiente como para su utilización en terapia humana (García de Quesada y col., 1975).

A partir de las partes aéreas de *Sideritis pusilla* (Lange) Pau., se obtuvieron el 1,17-diacetilsideritol, 1,17-diacetiljativatriol y 1,12- diacetiljativatriol . Además, se identificaron los compuestos ya conocidos tobarrol, 12-acetiljativatriol, 1-acetiljativatriol, isosideritol, 1-acetilsideritol y serradiol (García-Granados y col., 1982 y 1984).

Se estudiaron los componentes terpénicos de dos especies del Género *Sideritis*: *Sideritis pusilla* (Lange) Pau. ssp. *flavovirens* (Rouy) Malagarriga y *Sideritis leucantha* Cav. var. *flavovirens* Rouy, con objeto de clarificar los continuos problemas planteados en su clasificación botánica. A partir de esta última se obtienen tres compuestos mayoritarios: linearol, sidol y foliol. Los componentes terpénicos de *Sideritis pusilla* ssp. *flavovirens* son muy distintos: 7-acetilpusillatriol (aislado anteriormente de *Sideritis pusilla* (Lge) Pau.), tartesol (obtenido por primera vez a partir de *Sideritis grandiflora*), pusillatriol y *ent*-7 α ,18 dihidroxi-14 β -acetoxibeyer-5-eno (García-Granados y col., 1984; García de Quesada y col., 1973; Rabanal y col., 1974).

Posteriormente, se obtuvieron catorce acetatos hidroxibeyerénicos, un *ent*-kaur-15-eno (siderol) y un nuevo *ent*-7 α ,18 dihidroxibeyer-15-eno (flavovirol) a partir de *Sideritis pusilla* ssp. *flavovirens* (García-Granados y col., 1984).

A partir de *Sideritis varoi* nijarensis se obtuvieron 1 α ,4 α -oxi-6 β -acetoxieudesmano, 1 β -hidroxieudesm-3,5-dieno, 1 α ,5 α -dihidroxi-6 β -acetoxieudesm-4,(15)eno, y 6 β -hidroxieudesm-1,4-dien-3-ona (Cabrera y col., 1988).

A partir de *Sideritis varoi* ssp. *cuatrecasatii*, García-Granados y col., 1989, obtuvieron dos sesquiterpenos aromadendranos: 4 β ,9 β -dihidroxiaromadendrano (sesquivarodiol

I) y 4 β -hidroxi-9 β -acetoxiaromadendrano.

El distanol fue aislado de *Sideritis distans*; el óxido del *ent*-16-hidroxi-13-*epi*-manoílo, un nuevo derivado del óxido de *ent*-13-*epi*-manoílo, a partir del extracto hexánico de *Sideritis javalambrensis* Pau. (Venturela y col., 1989; Alcaraz y col., 1989).

Aceites esenciales

Los aceites esenciales son en parte los responsables de la acción bacteriostática y bactericida atribuida a estas especies y que justifica su empleo en medicina popular; así mismo, contribuyen a mejorar las características organolépticas de su infusión. Se ha demostrado su actividad "in vitro" frente a bacterias Gram +, levaduras y micobacterias.

Son numerosos los compuestos aislados a partir de las hojas e inflorescencias de distintas especies de *Sideritis* tanto españolas como de otras zonas del área mediterránea, fundamentalmente Turquía y Grecia (en este último país, la infusión de estas plantas se denomina "té de la montaña" y su consumo está muy extendido).

Partiendo del aceite esencial de *Sideritis mugronensis*, Villar y col., 1984d identificaron 47 compuestos distintos, destacando por su riqueza: α - y β -pineno, mirceno, Δ^1 -careno, β -felandreno, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, α -copaeno, β -bourboneno, α -terpinil acetato, β -cariofileno, alo-aromadendrano, α -cubebeno, germacreno B, δ -cadineno, nerodiol, calacoreno, farnesol y α -bisabolol.

Así mismo, Mateo y col., 1983 y 1988 aislaron múltiples componentes del aceite esencial de once especies de *Sideritis* del centro y sur de España (*S. spinulosa*, *S. linearifolia*, *S. mugronensis*, *S. serrata*, *S. leucantha* Cav. ssp. *bourgeana* y *S. pusilla* - recogidas en dos localidades diferentes-, *S. arborescens*, *S. ilicifolia* y *S. hirsuta*. De ellos destacan α -pineno y 1,8-cineol por su elevado porcentaje, y, en un segundo plano, sabineno, mirceno, linalol, 4-terpineol y óxido de cariofileno.

Gergis y col., 1989, identificaron más de 80 compuestos a partir de diversas especies de este Género, algunos de los cuales no habían sido descritos anteriormente en el mismo. Posteriormente, estos mismos autores relacionaron la composición química de este aceite esencial con la actividad antimicrobiana de *Sideritis sipylea* Boiss (Gergis y col., 1991).

Es necesario reseñar que los compuestos aislados a partir de especies de *Sideritis* griegas son muy similares a los obtenidos en las especies españolas, aunque ambas no pertenezcan a la misma sección dentro del Género.

II.3.- COMPUESTOS FLAVÓNICOS

II.3.1.- Generalidades. Estructura y propiedades generales. Reacciones de caracterización.

Los flavonoides forman uno de los grupos de compuestos fenólicos más abundantes en el Reino vegetal, y pueden ser considerados componentes típicos de Angiospermas leñosas, ya que su formación en las plantas se encuentra asociada a la lignificación de tallos, así como a la absorción de luz ultravioleta en las flores. Por esto son menos frecuentes en Angiospermas herbáceas y aparecen de forma excepcional en plantas inferiores.

Los compuestos flavónicos son los colorantes amarillos de las flores, frutos, hojas, cortezas, raíces, etc. de los vegetales; así mismo, los antocianos, pigmentos flavónicos solubles en agua y visibles al ojo humano, confieren coloración naranja brillante, rosa, rojo, violeta, escarlata, malva y azul a los pétalos y frutos de plantas superiores.

Se encuentran normalmente en zonas externas de la planta, sobre su superficie o asociadas a estructuras de secreción, en células fotosintéticas. Su mayor o menor lipofilia excluye su acumulación en el entorno acuoso celular, y esto lleva a un incremento externo como consecuencia de excreción glandular o epidérmica. Como heterósidos se encuentran disueltos en el espacio intracelular; cuando su contenido es muy elevado aparecen como cristales o masas coloreadas de amarillo, a la vez disueltos y precipitados.

El fenómeno de excreción de flavonoides ocurre preferentemente en plantas de regiones áridas y semiáridas: desiertos del sur de los Estados Unidos de América, México y zona del Mediterráneo, montañas de Centroeuropa, Suráfrica, Himalaya y Australia.

Las mezclas de flavonoides y terpenos parecen actuar como filtro de las radiaciones ultravioleta, como reductores del calor, agentes antimicrobianos o ahuyentadores de insectos. Existen algunas especies norteafricanas de *Sideritis* que no producen esta mezcla de flavonoides y terpenos; en su lugar, se protegen de la radiación ultravioleta con una densa mata de pelo blanco que recubre sus hojas.

La acumulación de agliconas de flavonoides está a menudo relacionada con la existencia de estructuras secretoras y la producción de otras sustancias lipofílicas naturales.

El esqueleto básico del cual derivan los distintos tipos de compuestos flavónicos lo constituye el anillo de cromona (benzo- γ -pirona). Biosintéticamente, su origen es muy complicado en su estructura.

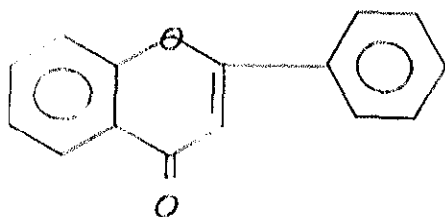
La secuencia 2', 4', 6' justifica su origen a partir de un triacetato condensado sobre un ácido *p*-cumárico. Esta hipótesis ha sido confirmada por distintos marcadores y estudios enzimáticos.

El intermediario común en la síntesis de todos los flavonoides es la chal, formada a partir del *p*-cumaroyl-CoA; las hidroxilaciones y metilaciones (cuando aparecen) son posteriores a la ciclación. La ciclación no genera flavanonas, sino que estas aparecen de forma específica a través de la acción de una chalcona isomerasa.

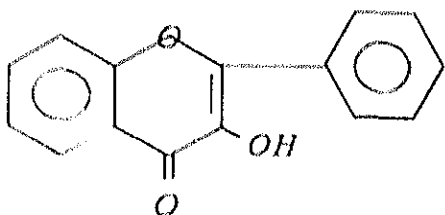
Los mecanismos que explican la formación de los diferentes tipos de flavonoides no son conocidos en su totalidad, y son posibles varias hipótesis como la intervención de radicales libres o de α -hidroxichalconas.

A partir del núcleo fundamental de flavona, se obtienen distintos grupos estructurales:

FLAVONOIDES MAYORES

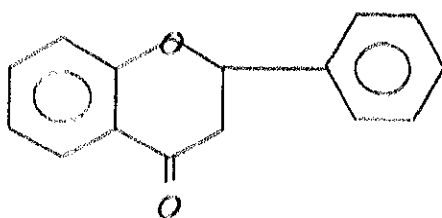


FLAVONAS

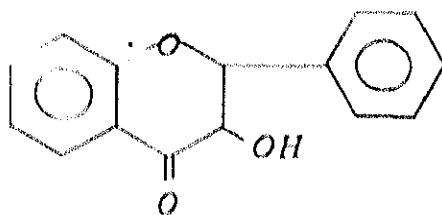


FLAVONOLES

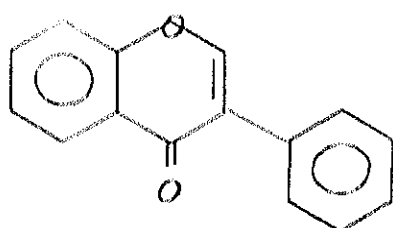
FLAVONOIDES MENORES



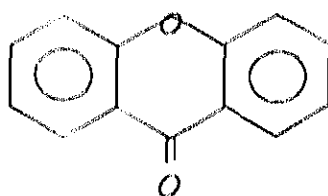
FLAVANONAS



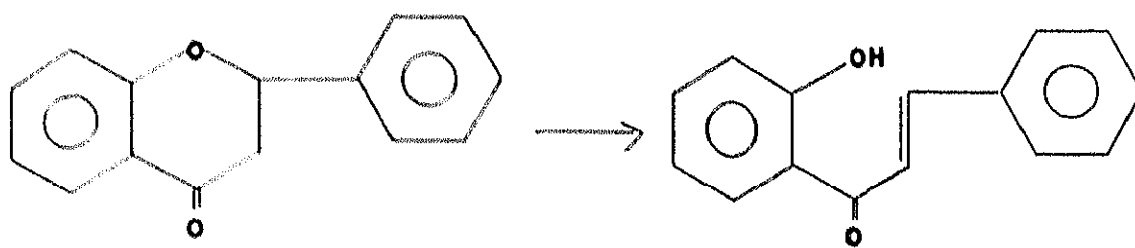
FLAVANONOLES O
DIHIDROFLAVONOLES



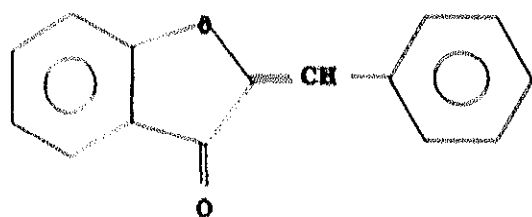
ISOFLAVONAS



XANTONAS

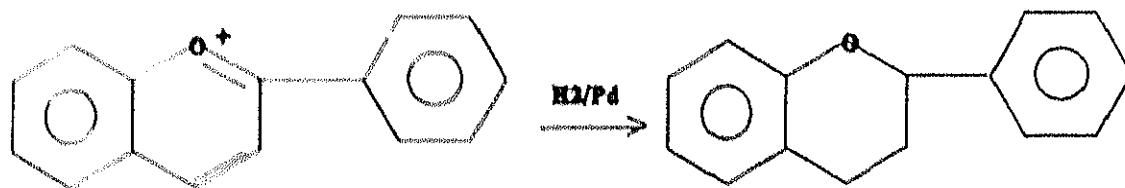


CHALCONAS



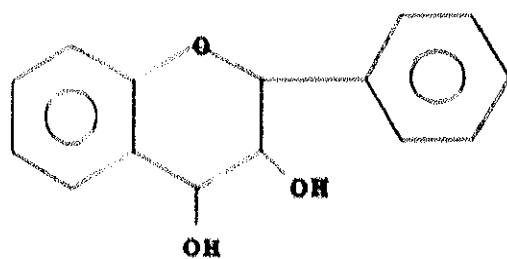
AURONAS

COMPUESTOS RELACIONADOS

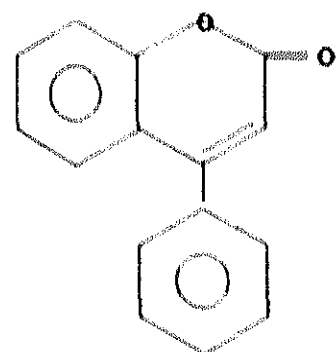


ANTOCIANOS

CATEQUINAS



LEUCOANTOCIANOS



NEOFLAVONAS

Sobre estas estructuras se pueden producir hidroxilaciones, metilación de grupos hidroxilo o del núcleo, isoprenilación, metilación de dos grupos hidroxilo en orto, dimerización y formación de O-heterósidos por la unión de un azúcar a la genina a través de un átomo de oxígeno, o C-heterósidos si la unión del azúcar es de tipo carbono-carbono. Los flavonoides polimetoxilados aparecen siempre libres.

Los O-heterósidos más frecuentes son los formados por unión del azúcar a las posiciones 3 ó 7, siendo los azúcares más habituales los monosacáridos D-glucosa, L-ramnosa, arabinosa y galactosa, y los disacáridos rutinosa y glucorramnosa; no son frecuentes cadenas azucaradas más largas.

La mayoría de los C-heterósidos están formados por la unión de una molécula de glucosa al carbono en posición 8.

Los heterósidos son solubles en agua, alcohol, mezclas hidroalcohólicas y acetato de etilo. Las geninas libres son insolubles en agua, solubles en disolventes orgánicos y acetato de etilo. Ambos son solubles en agua alcalina, dando un color amarillo que desaparece al acidular. En el caso de los flavonoides libres (agliconas o geninas), al acidular se produce su precipitación.

Las reacciones de caracterización se basan en la presencia de grupos hidroxilo fenólicos que actúan como cromóforos y explican la solubilidad en hidróxidos alcalinos, propiedades reductoras, reacciones cromáticas, o en la presencia del núcleo fundamental de cromona.

A) Reacciones debidas a los grupos fenólicos.

A.1. - Flavonoide más álcali (NaOH, KOH)

Produce una disolución de color amarillo o intensificación del color de la disolución inicial de la droga.

A.2. - Flavonoide más sales metálicas

- Flavonoide más FeCl_3 : solución color verde.
- Flavonoide más AlCl_3 : fluorescencia amarillo intensa al ultravioleta.

B) Reacciones debidas a las propiedades reductoras de los grupos fenólicos.

B.1.- Reacción de Fehling

B.2.- Reducción de nitrato de plata amoniacal

B.3.- Reducción de ferrocianatos, fosfotungstenatos, etc.

C) Reacciones debidas al anillo de cromona

C.1.- Reacción de la cianidina o del hidrógeno nascente.

A la solución del flavonoide se le adicionan magnesio o zinc con ácido clorhídrico; se produce desprendimiento de hidrógeno que reduce la molécula de flavonoide, obteniéndose un color característico según el tipo del mismo:

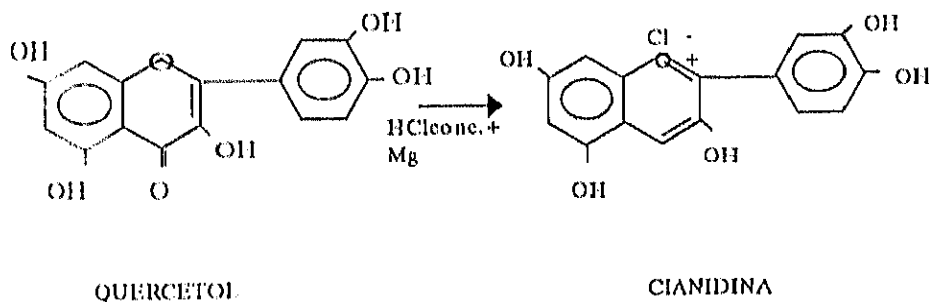
Flavonas: color naranja

Flavonoles: color rojo-rojo cereza

Flavanonas: color rojo violáceo

Los flavonoides menores no dan reacciones de coloración.

Como ejemplo tenemos la reacción del quercetol.



Los colores obtenidos son estables y se pueden cuantificar mediante una valoración colorimétrica.

C.2.- Reacción óxalo-bórica.

Flavonol más ácido bórico más ácido oxálico: derivado del ácido bórico que presenta fluorescencia amarillo-verdosa.

C.3.- Chalconas más pentacloruro de antimonio: color rojo o violeta.

Debido a su esqueleto básico, los flavonoides presentan absorción a la luz ultravioleta, dando lugar a un espectro de absorción característico que es determinante para su identificación (esta técnica se estudia en el punto II.3.3.6).

Hidrólisis de los heterósidos

Se realiza con el objeto de conocer la estructura, tanto de la genina flavónica, como del azúcar o azúcares que se encuentran formando la molécula. Existen dos tipos:

a) Hidrólisis ácida

Se somete el extracto de la planta al tratamiento con agua y ácido clorhídrico al baño maría con refrigerante durante dos horas. Al cabo de este tiempo se lleva al frigorífico durante tres horas y posteriormente se filtra. El filtrado se debe guardar puesto que contiene los azúcares. El precipitado se lava con agua fría y se seca a 130°C durante tres horas.

Esta técnica también puede ser aplicada a la hidrólisis de heterósidos en cromatografía en capa fina.

b) Hidrólisis enzimática

Requiere el empleo del enzima específico para una determinada unión heterosídica. Así, por ejemplo, para la hidrólisis del Rutósido se emplea Ramnodiastasa, obtenida a partir de *Rhamnus utilis* Decre.

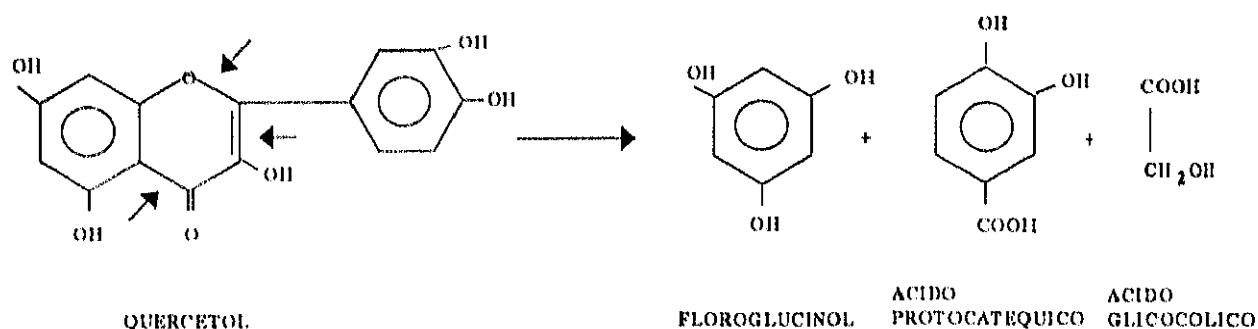
Para la identificación de los azúcares una vez realizada la hidrólisis se emplean fundamentalmente dos técnicas, la polarimetría, la cual nos dará la desviación característica de cada azúcar, y la cromatografía.

La reacción alcalina es un procedimiento empleado para reconocer los flavonoides presentes en una determinada muestra a través de los productos que resultan de su descomposición.

La muestra a estudiar se pone en contacto con KOH a temperatura elevada; así se obtienen los compuestos de la destrucción de fenatos y sales alcalinas. Estos se extraen con un exceso de ácido y éter etílico.

Este método no debe ser utilizado cuando los compuestos flavónicos sean polimetoxilados, ya que estos grupos resultarán hidrolizados.

Así, al realizar la reacción alcalina del Quercetol se obtienen Floroglucinol, Acido protocatéquico y Acido glicólico.



II.3.2.- Funciones e interés de los flavonoides

A) En los vegetales

1.- Antioxidantes

Los flavonoides son fácilmente oxidables; este proceso va acompañado de la apertura del anillo de γ -pirona. Parece ser debido a su capacidad de formar quelatos con metales, fundamentalmente en las agrupaciones 3-hidroxi, 4-carbonil y 3',4'-dihidroxi (Baleriola, 1979).

Su acción antioxidante puede explicar su interferencia en la acción de oxidorreductasas. Es de esperar que estos compuestos presenten esta actividad, ya que son potentes captadores de radicales libres; pueden suprimir la formación de estos radicales mediante la unión a iones metálicos pesados que catalizan procesos que llevan a la producción de los mismos.

Algunos autores creen que la función más importante de los flavonoides en las plantas es la de contrarrestar la acción oxidante de los lípidos y poliacetilenos presentes en los tejidos vegetales.

2.- Reguladores del crecimiento

No existe evidencia de su importancia en el crecimiento o metabolismo, aunque los monohidroxifenoles son cofactores de la ácido indolacético oxidasa (IAA oxidasa), enzima que inhibe al ácido indolacético; este compuesto es una de las principales hormonas del crecimiento de las plantas. Los dihidroxifenoles como la quercetina inhiben dicho enzima.

3.- Resistencia a las enfermedades

"In vitro" se ha observado una función protectora que es más difícil de demostrar "in vivo".

Sin embargo, se puede decir que los flavonoides y compuestos relacionados son responsables, al menos en parte, de la resistencia de las plantas a las invasiones fúngicas, ya que los flavonoides más oxigenados resultan tóxicos para los hongos.

4.- Pigmentos de flores

Son el grupo de sustancias colorantes más importante en las plantas, proporcionando tonalidades blancas, marfil, crema, amarillo, naranja, escarlata, malva y azul (Harborne, 1967). La mayoría de ellos son flavonas y flavonoles.

Las flavonas incoloras al visible pueden ser detectadas por las abejas y otros insectos, capaces de ver en la región ultravioleta, lo cual sirve para atraerlos hacia las flores y posibilitar la polinización.

Los productos de degradación de los flavonoides son responsables en gran parte de la coloración otoñal de las plantas.

5.- Inhibidores de enzimas

Presentan mayor potencia las flavonas y flavonoles hidroxilados en 3', 4' y 7. La metoxilación en 6 y 8 disminuye su actividad.

6.- Respiración y fotosíntesis

Los flavonoides se localizan en la membrana tilacoide. Probablemente participan en la fotosíntesis como transportadores de electrones o bien como reguladores de canales de iones relacionados con la fosforilación. Las interacciones existentes entre los flavonoides y las bombas ATPasa de protón y $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ en células animales sugieren que estos compuestos participan en dichos procesos.

Cuando las células fotosintéticas mueren, los flavonoides son liberados y aparecen en el zumo de la planta, en el néctar y la resina.

Algunas agliconas inhiben la fosforilación mitocondrial; las más activas son las que tienen libres las posiciones 3 y 4'.

B) Interés farmacológico y clínico

La alta reactividad química de los flavonoides se refleja en su gran afinidad por polímeros biológicos e iones de metales pesados, así como en su capacidad para catalizar el transporte de electrones y captar radicales libres. Así, los flavonoides se unen a diversos enzimas, transportadores de hormonas y ADN.

Los flavonoides presentan una gran afinidad por iones divalentes de metales pesados como Cu^{2+} y Zn^{2+} . La posición de los sustituyentes hidroxilo y las propiedades electrónicas del sistema de anillos sugieren que los flavonoides podrían ser buenos ligandos para los electrones d_3 de los elementos de transición del tercer período.

Se ha demostrado que algunos flavonoides son mutagénicos en el test de Ames. Esta acción puede ser debida a su semejanza estructural con los nucleósidos, lo cual llevaría a la intercalación del sistema de benzopirona entre las bases. Sin embargo, el test de Ames no es capaz de distinguir entre la desrepresión de genes normalmente inactivos y mutaciones reales. De hecho, no se han observado efectos colaterales graves tras el uso de flavonoides a dosis moderadas ($< 1\text{g/día/paciente adulto}$).

Las aplicaciones terapéuticas de los flavonoides estaban basadas en el empirismo, ya que hasta hace poco el conocimiento de la bioquímica de los flavonoides no era suficiente para una aplicación médica racional de estas sustancias. La siguiente tabla recoge un listado de los trastornos que han sido tratados con flavonoides (Havsteen, 1983):

TRASTORNO	LUGAR DE ACCIÓN	FLAVONOIDES	RESULTADO
Inflamación	Síntesis de PG	Quercetina, etc'	Disminución del dolor local. Normalización de la temperatura corporal.
Alergia	H ⁺ -ATPasa de mastocitos	Cromoglicato disódico Quercetina, etc	Prevención de la secreción de histamina, etc.
Dolor de cabeza	Síntesis de PG	Quercetina, etc	Disminución del dolor.
Parodontosis	Pared capilar (PG)	Quercetina, etc	Disminución del sangrado. Normalización del tejido.
Infección viral	H ⁺ -ATPasa de membrana lisosomal	Quercetina, etc	Prevención de la separación de la piel.
Resfriado común	H ⁺ -ATPasa de membrana lisosomal	Quercetina, etc	Sin evidencia científica.
Oncogénesis química	Aril-hidroxilasa Epóxido-hidroxilasa	Quercetina, etc	Sólo experimentos en laboratorio.
Picadura de abeja	Síntesis de PG	Quercetina, etc	Disminución del dolor local.
Cirugía oral	Síntesis de PG	Quercetina, etc	Disminución del dolor local.
Úlcera gástrica o duodenal	Síntesis de PG	Quercetina, etc	Cese del sangrado. Disminución del dolor.
Cáncer	(Na ⁺ -K ⁺) ATPasa	Quercetina, etc	Células normalizadas (probado sólo en cultivos de células).
Diabetes mellitus	Aldosa reductasa Pared capilar	Quercetina, etc Rutina/Citrina	Disminución de la presión ocular. Cese del sangrado.

PG: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

1.- Acción antiinflamatoria y antiulcerosa

El proceso inflamatorio va acompañado de la liberación de prostaglandinas, las cuales, por quimiotaxis, atraen leucocitos al lugar de la lesión; esto produce dolor local y, después de su transporte por el torrente sanguíneo hasta el cerebro, aumenta la temperatura corporal por desplazamiento del balance del centro termorregulador. La conocida inhibición de la prostaglandina cicloxigenasa y la lipoxigenasa lleva a una disminución del dolor local y a un efecto antipirético (Havsteen, 1983)

En el caso del dolor de cabeza éste puede ser causado por una inflamación local, con lo cual, su alivio puede ser explicado como en el caso anterior.

Son numerosos los flavonoides aislados con actividad antiinflamatoria: hesperidina, naringenina y neohesperidina, (Arriaga y col., 1990) están presentes en el extracto acuoso de flavonoides de cítricos. Este extracto inhibe el incremento de la permeabilidad, primera manifestación en la inflamación.

Se ha estudiado la actividad antiinflamatoria de varias especies del género *Sideritis*, observándose la inhibición de la inflamación tanto aguda como crónica en el edema inducido por carragenina (Villar y col., 1982a y 1982b; Villar y col., 1984b; Villar y col., 1985b; Jiménez y col., 1986; Villar y col., 1986a; Alcaraz y col., 1988; Jiménez, 1988; Heras Polo, 1992; Zarzuelo y col., 1993; Heras y col., 1994). En muchos casos se pudieron aislar los compuestos responsables de esta actividad, como hypolaetina-8-O- β -D-glucósido (Villar y col., 1985a y 1985b; Barberán y col., 1987), y sideritoflavona (Barberán y col., 1987).

La combinación de actividades antiinflamatoria y antiulcerosa o protectora gástrica que presentan estos compuestos no es frecuente pero resulta muy favorable.

2.- Acción vasoprotectora

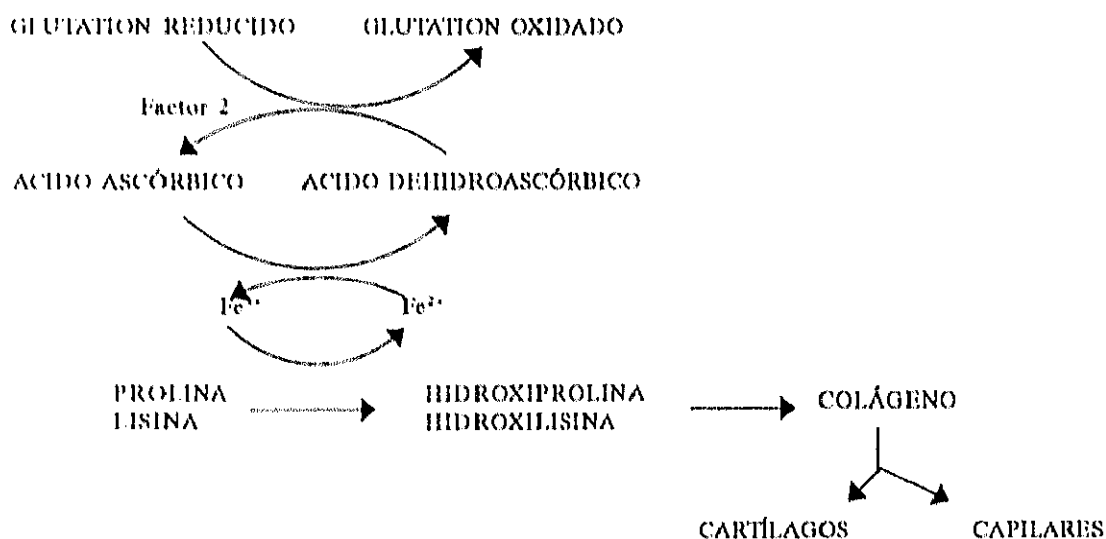
Se denomina "Factor P" o "Vitamina P" a aquellas sustancias polifenólicas con capacidad de disminuir la permeabilidad capilar, aumentando así su resistencia. Su mecanismo puede ser una combinación de la supresión en la síntesis de prostaglandinas y la estimulación de la hidroxilación de prolina. Se sabe que las prostaglandinas activan la elastasa y otras

hidrolasas catabólicas; por lo tanto, la disminución de su síntesis puede explicar el fortalecimiento del tejido conectivo.

Estos compuestos se aplican en parodontosis (trastorno que cursa con inflamación y destrucción del tejido conectivo), accidentes hemorrágicos, hematomas, edemas, varices, etc.

Los flavonoides actúan como agentes economizadores del ácido ascórbico al acelerar la reacción que transforma el ácido dehidroascórbico en ácido ascórbico, siendo intermediario el glutatión (Gil Muñoz, 1983). Además, forman quelatos con los metales, protegiendo así al ácido ascórbico de la oxidación (Baleriola, 1979).

El ácido ascórbico interviene en la síntesis correcta del colágeno, ya que hace posible la hidroxilación de lisina y prolina para obtener hidroxilisina e hidroxiprolina, sustancias que intervienen activamente en la síntesis del colágeno.



"In vitro", dihidroquercetina, rutina, narigenina y principalmente las catequinas, favorecen la solubilidad y estabilidad de las fibrillas del colágeno, así como la formación de muchos precursores de enlaces cruzados entre las fibrillas. Esto explica su actividad protectora en ciertas enfermedades del colágeno como el latirismo.

También se ha demostrado la actividad vasodilatadora de algunos flavonoides (entre ellos luteolina y kaempferol) sobre musculatura lisa de aorta en rata. Su mecanismo de acción parece ser la inhibición de la proteína quinasa C, aunque también pueden intervenir la inhibición de fosfodiesterasas cíclicas de nucleótidos o la disminución de los niveles de calcio.

Prolongan la acción de la adrenalina por inhibición de la o-metil transferasa.

Estimulan el eje pituitaria-adrenalina.

Los efectos beneficiosos de los flavonoides se ponen de manifiesto después de tratamientos de un mes o más de duración.

3.- Acción modificadora de los niveles de colesterol

La vitamina P incrementa la actividad lipolítica del suero y tiene discreta acciones hipolipemiente e hipocolesterolemiente. Así mismo, también se ha observado su actividad antihiperlipidémica, y actualmente se investiga en este sentido por su interés en la profilaxis de la arteriosclerosis.

4.- Acción antiagregante

Debido a que producen una disminución en la adhesividad de las plaquetas, los flavonoides actúan como preventivos de la trombosis (Hladovec, 1977), siendo los más activos las flavonas polimetoxiladas.

5.- Acción modificadora de la actividad enzimática

Es debida a la gran afinidad de los flavonoides por este tipo de moléculas. Su unión a los enzimas provoca su inactivación, siendo su acción más importante sobre varios tipos de hidrolasas: β -glucuronidasa, hialuronidasa, fosfatasa alcalina, arilsulfatasa, H^+ -ATPasas de membranas lisosomales y granulares y (Na^+-K^+) ATPasa de la membrana plasmática, β -galactosidasa, AMPc fosfodiesterasa, lipasas, liasas como la DOPA descarboxilasa, transferasas como la catecol-o-metil-transferasa, hidroxilasas como la arilhidroxilasa, oxidorreductasas como la aldosarreductasa y quinasas como la hexoquinasa

(Havsteen, 1983).

Sólo se conoce un caso de activación enzimática debida a la unión de flavonoides: la prolina hidroxilasa, debido probablemente al potencial electroquímico del flavonoide más que a un mecanismo alostérico, catálisis ácido/base o estabilización del centro activo.

La más estudiada es la actividad desacopladora que presentan sobre la fosforilación oxidativa.

6.- Acción estrogénica

Se localiza únicamente en el grupo de las isoflavonas, con estructura y actividad similares al estilbestrol. Presentan efecto estrogénico, observado en ovejas que consumieron una elevada cantidad de planta; éste es debido a la relación espacial existente entre los grupos hidroxilo del estradiol y algunos isoflavonoides. Por lo tanto, cuando estos flavonoides se unen al receptor estrogénico citosólico, pueden deprimir el mismo gen que los auténticos estrógenos.

Sin embargo, en órgano aislado no se obtiene actividad a no ser que se asocien con progesterona (Baleriola, 1979).

7.- Actividad antineoplásica

Se han tratado cultivos de células cancerígenas de distintos tipos con flavonoides. Parece ser que estos consiguieron normalizar la eficiencia de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ de las membranas de las células dañadas. Sin embargo, no se han realizado estudios clínicos sobre el tratamiento del cáncer con flavonoides, probablemente debido a la dificultad en conseguir que estos compuestos alcancen la zona afectada. Se ha observado una mejoría al tratar cáncer de la zona oral de pacientes fumadores, aunque las circunstancias de estos casos no han sido controladas perfectamente.

Quercetina y sus glicósidos, apigenina, morelloflavona, volkensiflavona y fugalina y otras flavonas altamente metoxiladas inhiben tejidos tumorales.

Parece que las flavonas muy metoxiladas son las que presentan mayor actividad antitumoral; algunos glucósidos como quercetagrina, patuletina y rutina también pueden presentarla, aunque posiblemente con menor potencia.

8.- Actividad antimicrobiana

Aparentemente, una infección viral no se produce hasta que la digestión lisosomal provoca la destrucción de la capa protéica que rodea al ácido nucléico. El proceso de digestión lisosomal requiere la fusión de la cápsula del virus con la membrana lisosómica, lo cual requiere la intervención de una protón-ATPasa y, probablemente, una fosfolipasa A₂. Los flavonoides y compuestos relacionados inhiben ambas enzimas.

Los extractos de agliconas de flavonas suelen presentar actividad antimicrobiana, aunque a concentraciones elevadas si se comparan con antibióticos.

En muchos casos, al ensayar esta actividad con principios activos aislados a partir de extractos con potente actividad antibacteriana o antifúngica, queda muy disminuida; esto hace suponer que, o bien existe potenciación entre las sustancias del extracto, o que las sustancias realmente activas no han sido aisladas.

Algunos autores hacen responsables de esta acción a los ácidos fenólicos que se suelen encontrar en dichos extractos.

9.- Otras actividades

- Actividad espasmolítica

Son más activas las agliconas que sus correspondientes glicósidos, y dicha actividad está en relación al número de grupos hidroxilo, siendo necesarios en posición 5 y 7.

- Actividad β -bloqueante

Se ha observado la actividad bloqueante β -adrenérgica de algunos derivados sintéticos de flavonas que llevan la cadena básica del propranolol sobre el anillo B.

- Antialérgica

Algunas flavonas, y fundamentalmente la quercetina, interfieren en la actividad de las ATPasas transportadoras en las membranas, incluyendo las calcio-dependientes (asociadas a la salida de calcio desde el citosol celular). Incrementan la eficiencia del transporte de iones, produciendo consumo de ATP.

Debido a su analogía estructural con el antialérgico cromoglicato, se pensó en la posible aplicación de las flavonas en este campo.

Las flavonas previenen la secreción de histamina como respuesta a un antígeno. Las más activos son fisetina y quercetina, y, en segundo lugar, miricetina y Kaempferol.

- Anticatarral

Parece ser que su efecto es más preventivo que curativo.

- Antidiabética

La diabetes mellitus lleva, especialmente en los estados finales de la enfermedad, a un aumento en el contenido de lípidos sanguíneos y a un estrechamiento de los vasos. Esto puede causar una disminución considerable del drenaje de los ojos e intestinos. La presión de retorno y la presión osmótica del galactitol, el cual no puede ser metabolizado por células humanas, pueden producir trastornos visuales y una deficiente absorción intestinal. El enzima que reduce la glucosa a galactitol es la aldosa reductasa; este enzima es inhibido por los flavonoides a través de un mecanismo todavía desconocido.

El microsangrado que puede aparecer en la diabetes mellitus también desaparece con los flavonoides.

Farmacocinética y toxicología de flavonoides

Los flavonoides son metabolizados por las células hepáticas fundamentalmente. Se han detectado en orina distintos metabolitos de flavonoides marcados como 3,5-dihidroxifenilacetato y 3-hidroxifenilacetato. Por lo tanto en el cuerpo no se acumulan residuos de flavonoides.

La toxicidad de estos compuestos es muy baja en animales; para ratas, la DL_{50} por animal es de 2-10 g/Kg peso para la mayoría de los flavonoides. Una dosis equivalente en humanos es impensable; como precaución se recomiendan dosis inferiores a 1g por adulto y por día (Flavsteen, 1983).

C') Interés en alimentación

Ciertas dihidrochalconas como las de naringenina y neohesperidina son edulcorantes potentes, lo que les confiere una gran importancia económica e industrial. Son utilizados como edulcorantes bajos en calorías.

Algunos glicósidos de flavanonas, muy abundantes en las cortezas de los cítricos, son muy amargos. Este sabor se ha relacionado con el diglicósido neohesperidósido (2-O- α -ramnosil- β -D-glucósido).

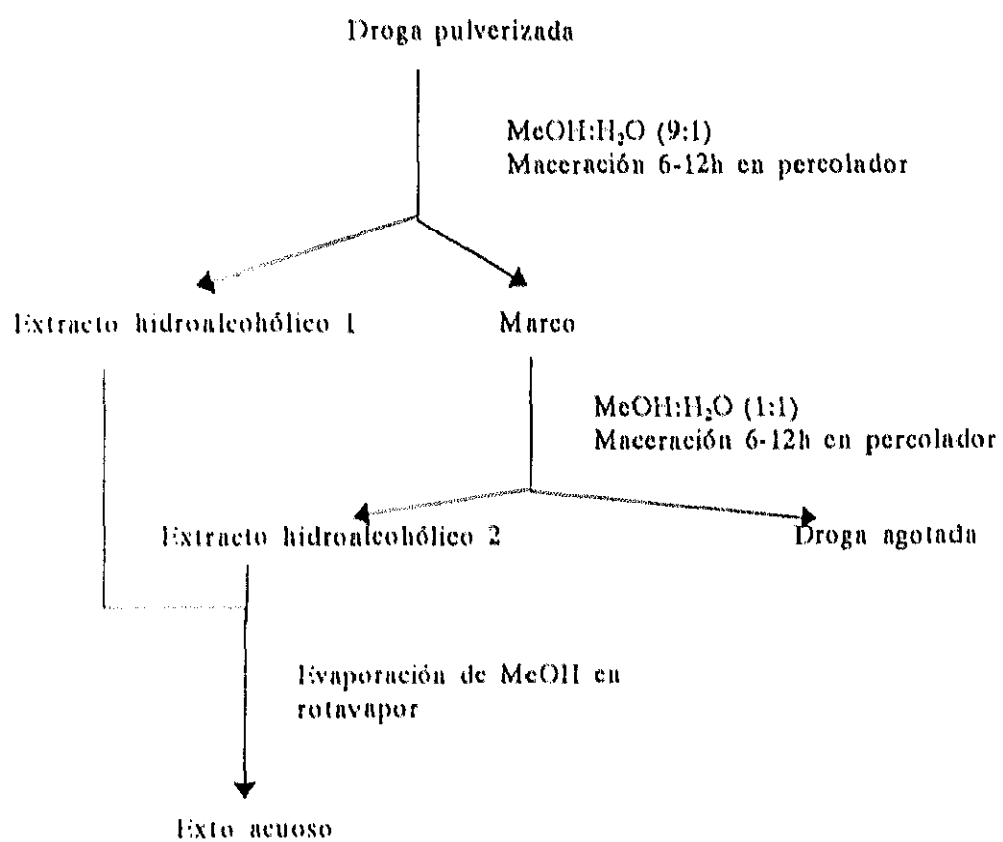
II.3.3.- Extracción, aislamiento y purificación. Técnicas preparativas y analíticas.

La condición ideal es partir de material vegetal fresco, aunque también se puede utilizar el desecado si ha sido convenientemente almacenado. Sin embargo, en un material muy antiguo existe la tendencia a la hidrólisis de los glicósidos por la acción de los hongos, así como a la oxidación de las agliconas más sensibles.

Se recomienda que, una vez recolectado el material vegetal fresco, se aparte un espécimen como muestra de herbario, mientras el resto se secará lo más rápidamente posible para prevenir la acción enzimática. El secado se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o en hornos, a unos 20-40°C para hojas, sumidades y flores, y entre 30 y 65°C para cortezas y raíces. El material desecado se puede almacenar como tal o tras su pulverización.

Existen varias técnicas para la extracción de flavonoides a partir del material vegetal. Todas ellas tienen en cuenta que, tanto el aumento de grupos hidroxilo en la molécula como la existencia de heterósidos, lleva a un aumento de la polaridad, mientras que un elevado número de grupos metoxilo produce una disminución de ésta.

La extracción más general se realiza en dos pasos, recogidos en el siguiente esquema:



Para purificar el extracto acuoso de contaminantes de menor polaridad como grasas, terpenos, clorofilas, xantofilas, etc, se realiza una extracción líquido/líquido con hexano varias veces. Aunque es muy poco probable que el extracto apolar contenga flavonoides, no se debe descartar sin antes realizar un examen cromatográfico, como mínimo en capa fina.

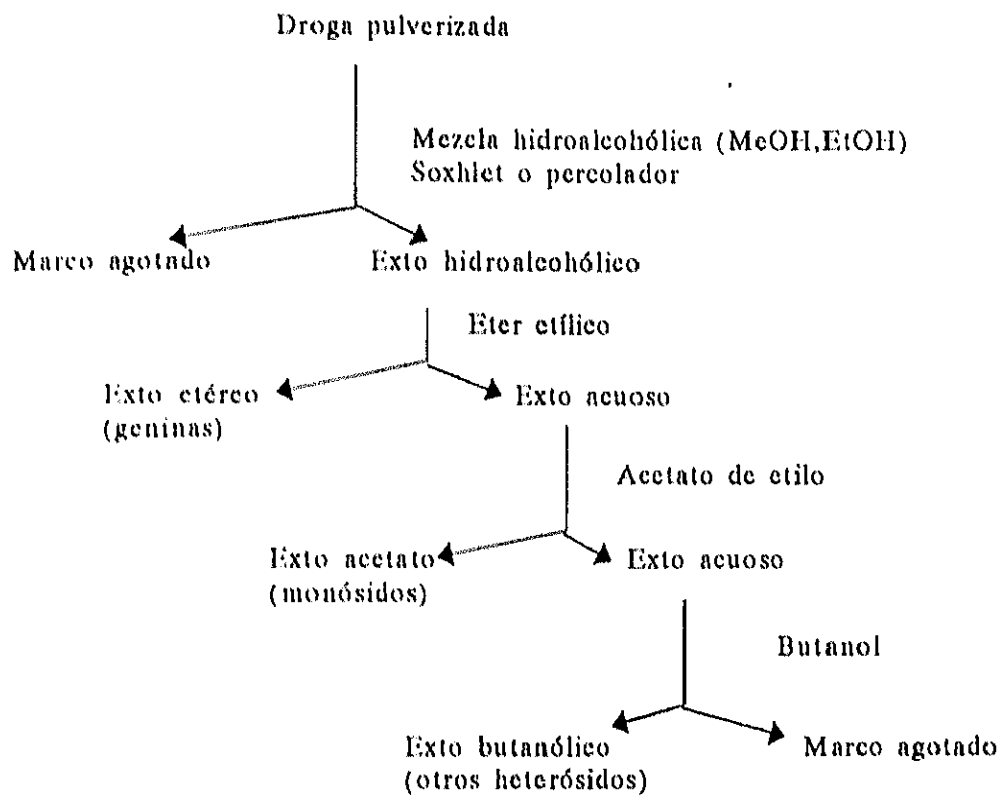
El extracto acuoso se concentra a sequedad en un rotavapor.

Este proceso es útil para la extracción de la mayoría de los compuestos flavónicos, pero no es válido para antocianos y flavonoides de baja polaridad, normalmente localizados en el exterior del vegetal.

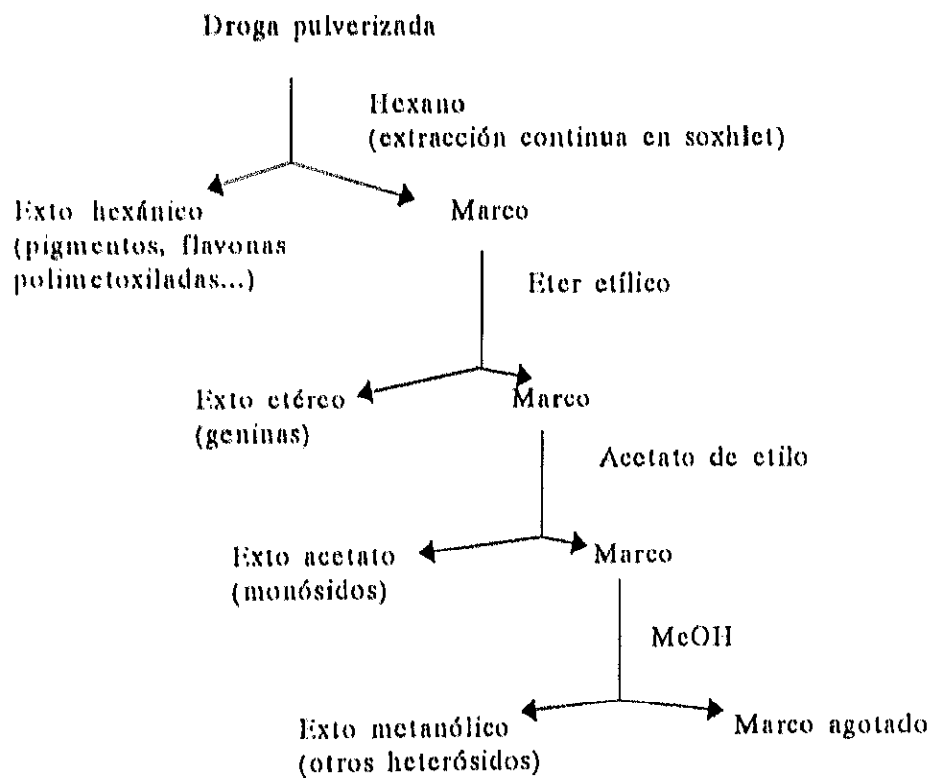
En el caso de los antocianos, las hojas o pétalos frescos se tratan con HCl concentrado al 1% en MeOH. La extracción se evidencia por la coloración de la solución, los análisis cromatográficos o espectroscópicos del extracto acuoso deben realizarse lo más rápidamente posible para minimizar el riesgo de hidrólisis de los glicósidos.

Otras dos posibles técnicas de extracción siguen los dos siguientes esquemas:

Proceso 1



Proceso 2



Sea cual sea la técnica de extracción elegida, todos los extractos finales se concentran hasta sequedad a presión reducida para la identificación posterior de los compuestos flavónicos por diversas técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

Algunos autores apuntan la importancia del estudio de los flavonoides de excreción de las distintas especies a estudiar. Se trata de flavonoides altamente metoxilados que son excretados por el vegetal junto con otros compuestos apolares. Para el estudio de estos flavonoides se sumerge la parte aérea de la droga en cloroformo durante dos minutos; posteriormente se decanta y el extracto clorofórmico se extrae con metanol. La solución alcohólica se concentra y en ella se estudia la presencia de flavonoides (Wollenweber y Jay, 1988; Tomás-Barberán y col., 1988)

La identificación de los compuestos flavónicos presentes en una especie requiere su aislamiento previo, contando con un estado de pureza conveniente; para conseguirlo es necesario el empleo de una serie de técnicas preparativas.

II.3.3.1.- Cromatografía en papel.

Esta técnica ha sido muy empleada debido a su sencillez, capacidad de adaptación para distintos tipos de condiciones cromatográficas (fase móvil y muestras de distinta naturaleza) y su bajo coste.

Sin embargo, hoy en día ha sido sustituida casi totalmente por la cromatografía en capa fina, que suma a las ventajas de la cromatografía en papel, una mayor velocidad de análisis y mayor reproductibilidad de los resultados obtenidos debido a la mayor uniformidad de la fase estacionaria sobre el soporte sólido.

II.3.3.2.- Cromatografía en capa fina.

Es una técnica particularmente útil para los siguientes propósitos:

- a) aproximación a la identificación de los principios activos mediante el empleo de patrones y el cálculo del R_f ;
- b) investigación de solventes con posible aplicación en cromatografía en columna;
- c) análisis de las fracciones obtenidas a partir de cromatografía en columna;
- d) seguimiento de una reacción controlada como hidrólisis o metilación;
- e) aislamiento de los principios activos puros a pequeña escala.

Existe una amplia bibliografía sobre las fases estacionarias, fases móviles y condiciones especiales utilizadas en el estudio de flavonoides (Stahl, 1973; Barberán y col., 1984b; Villar y col., 1984c; Wagner, 1984; Ríos y col., 1986; Franco y col., 1989; Heimler y col., 1989).

Una vez desarrollado el cromatograma es necesario proceder a su revelado para poner de manifiesto la presencia de los compuestos a estudiar.

En primer lugar, se observa la placa bajo luz UV (366 y 254 nm). Los flavonoides presentan fluorescencia amarillo-anaranjada o coloración oscura respectivamente a estas longitudes de onda. Posteriormente, se somete la placa a vapores de amoníaco; se deja secar y se observa de nuevo a la luz UV. Esto permite una identificación aproximada de los compuestos a través de las coloraciones obtenidas.

1.- Flavonoides que bajo el UV largo (366 nm) presentan coloración púrpura oscura.

Al ser sometidos a vapores de amoníaco:

a) Cambio a color amarillo verdoso o verde: 5-OH flavonas o 5-OH flavonoles sustituidos en el carbono 3 con OH libre en el carbono 4'.

b) No cambio de color o cambio muy leve: flavonas o flavonoles sustituidos en el carbono 3 con hidroxilo libre en el carbono 5 e hidroxilo sustituido en 4'. Algunas veces, flavonas con hidroxilo libre en los carbonos 6 u 8 o flavonoles sustituidos en el carbono 3 con hidroxilo libre en el carbono 5.

c) Azul: flavonas 5-hidroxi sustituidas.

d) Rojo o anaranjado: chalconas con hidroxilo libre en posiciones 2 y 4' o únicamente en 2.

2.- Flavonoides que al UV largo presentan fluorescencia azul.

Al ser sometidos a vapores de amoníaco:

Fluorescencia amarillo verdosa o azul verdosa: flavonas o flavanonas sin hidroxilo libre en posición 5. También, flavonoles sin hidroxilo libre en posición 5 y con el hidroxilo en posición 3, sustituido.

3.- Flavonoides que al UV largo aparecen como manchas de color amarillo o naranja fluorescente y que no cambian al ser expuestos a vapores de amoníaco: flavonoles con grupo hidroxilo libre en posición 3 con o sin hidroxilo libre en 5

4.- Flavonoides que al UV largo presentan fluorescencia amarilla que cambia a naranja o rojo con vapores de amoníaco: aurona con hidroxilo libre en posición 4' o C-2 o C-4 hidroxichalconas.

5.- Flavonoides que al UV largo presentan color amarillo verdoso, azul verdoso o verde con pequeño cambio de color al ser sometidos a vapores de amoníaco: aurona con hidroxilo libre en 4' o flavanona con hidroxilo libre en posición 5. También pueden ser

flavonoles con hidroxilo libre en posición 3 y con o sin hidroxilo libre en 5.

Por último, trataremos la placa con el revelador elegido:

- AlCl_3 (1-5% en EtOH): produce fluorescencia amarilla de los 5-OH flavonoides a 366 nm.

- Acido sulfanílico diazotado. Los compuestos con grupos fenólicos libres dan lugar a manchas amarillas, anaranjadas o rojas.

- Vainillina-HCl 5%. Este revelador reacciona con todos aquellos flavonoides que presenten un anillo de floroglucinol (anillo A) combinado con un anillo C saturado.

- NEU. Consta de dos soluciones:

- NP- difenilboriloxietilamina al 1% en MeOH

- PEG- polietilenglicol 4000 al 5% en EtOH

Se mezclan 10 ml de la primera solución con 8 ml de la segunda justo antes de su uso. Los flavonoides aparecen como manchas con fluorescencia amarillo-verdosa o anaranjada al UV (365 nm); los flavonoles constituidos por glicósidos de quercetina y miricetina ofrecen fluorescencia anaranjada al UV, mientras que los flavonoles formados por glicósidos de kaempferol e isoramnetina producen fluorescencia amarillo-verdosa. Los glicósidos de flavonas como luteolina y apigenina producen fluorescencia anaranjada y amarillo-verdosa, respectivamente.

11.3.3.3.- Cromatografía en columna.

La cromatografía en columna a presión normal o a media presión es muy utilizada para la purificación de las muestras extraídas del material vegetal (o de otra naturaleza, pero en la cual la sustancia a estudiar se encuentre formando parte de una mezcla compleja) previa a su análisis por otras técnicas más finas.

La columna está formada por un tubo de vidrio con una llave en el extremo inferior; sus dimensiones deben ser tales que la relación diámetro/longitud se encuentre entre 1:10 y 1:30. Tanto los diámetros de las columnas como de las partículas de relleno empleadas

(celulosa, poliamida, gel sephadex, o, fundamentalmente, silicagel) son muy variadas. El tamaño del relleno de columna es muy importante, ya que si es demasiado pequeño, el flujo del eluyente será demasiado bajo, y si es demasiado grande, la separación de los componentes de la mezcla puede ser insuficiente.

II.3.3.4.- Cromatografía en contracorriente de alta velocidad.

Es un método de separación relativamente nuevo definido como una cromatografía de partición sin soporte sólido. Se basa en el hecho de que dos líquidos inmiscibles que fluyen en contracorriente por un tubo helicoidal que gira en un campo de aceleración, se segmentan en las colas de la hélice.

Las ventajas de este método son:

a) Eliminación del soporte sólido. Esto evita las pérdidas por adsorción y desnaturalización de las muestras, así como su contaminación y la consiguiente aparición de colas en los picos.

b) Eliminación de cierres giratorios. Así se eliminan unas fuentes potenciales de merma, contaminación y corrosión en el sistema de flujo-centrífuga.

c) Admite un amplio espectro de muestras, desde pequeños iones y moléculas hasta macromoléculas y partículas. La elección del sistema de solventes es prácticamente ilimitada y es casi seguro encontrar un sistema aplicable a la muestra.

d) Cantidad de muestra ilimitada. Se puede por tanto utilizar con fines analíticos o preparativos.

e) Fácil manejo y bajo mantenimiento.

En cromatografía en contracorriente es importante elegir una fase móvil de forma que los compuestos problema sean eluidos a cierta distancia del frente del solvente, mientras las impurezas queden retenidas en la parte posterior de la fase estacionaria.

Independientemente de la fase utilizada como móvil, la separación se efectúa y el tiempo de retención (t_R) de cada compuesto se puede predecir a partir del coeficiente de partición, el cual se determina por una simple prueba de partición en un tubo de ensayo.

Una ventaja adicional de este método sobre otros métodos cromatográficos es que la mezcla problema puede ser introducida directamente en el soporte de la fase estacionaria, es decir, que no necesita una purificación previa.

Las rápidas y eficientes separaciones obtenidas pueden ser atribuidas a los efectos hidrodinámicos creados por combinación de una orientación coaxial de la bobina y un tipo particular de movimiento planetario suministrado por la bobina centrífuga. Se forma un campo de fuerza centrífuga complejo que separa las dos fases, de manera que una de ellas (fase de cabeza) ocupa totalmente la parte anterior (cabeza de la columna) y la otra (fase de cola) queda en la parte posterior. Se produce una gran agitación de los dos solventes en la zona próxima al eje centrífugo (zona de mezcla), mientras el resto de la columna presenta dos capas separadas, encontrándose la más ligera sobre la más pesada. Cada zona de mezcla se dirige hacia la cabeza de la columna al ritmo de una vuelta por revolución. Esto significa que las dos fases de solventes están sujetas a un proceso de partición de mezcla y separación en cualquier porción de la columna, con una frecuencia de 13 veces por segundo (800 rpm).

Por consiguiente, el sistema permite una alta eficiencia en la separación cromatográfica de solutos, incluso con un flujo elevado de la fase móvil.

Todas estas características de la cromatografía en contracorriente la convierten en una vía nueva y eficaz para extracción, separación y análisis de principios activos en plantas medicinales.

II.3.3.5. Cromatografía Líquida de Alta Resolución o Alta Eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida es una técnica cromatográfica utilizada desde hace tiempo. En un principio, el análisis se llevaba a cabo a presión ambiente, con lo cual el flujo del solvente y la separación de los compuestos era muy lenta (0.001 a 0.01 cm/s). Posteriormente se desarrollaron los métodos a media y alta presión, trabajándose por cromatografía a alta velocidad (aproximadamente 1 cm/s).

Con el fin de encuadrar la cromatografía líquida de alta resolución (o alta eficacia), podemos dividir los métodos cromatográficos líquidos en :

A) Según la naturaleza de las fases

- Cromatografía Líquido-Sólido: la fase estacionaria (o fija) es un sólido y la fase móvil, un líquido.

- Cromatografía Líquido-Líquido: la fase estacionaria es un líquido inmovilizado por un sólido al que impregna y la fase móvil, un líquido.

B) Según la naturaleza de la separación

- Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un sólido adsorbente y la separación de las moléculas se debe a la distinta adsorción de éstas en la fase fija. Por tanto, es una cromatografía líquido-sólido.

- Cromatografía de reparto. La fase estacionaria es un líquido no miscible con la fase móvil (también líquida), y la separación se basa en la distinta solubilidad de las moléculas en los distintos líquidos. Así, es una cromatografía líquido-líquido.

- Cromatografía de intercambio iónico o par iónico. Se aplica a la separación de moléculas fácilmente ionizables al aplicar un cambio de pH. La fase estacionaria es un sólido que contiene una fase líquida con los denominados contraiones, moléculas que retendrán a aquellos sustratos que presenten la carga adecuada. Permite separar sustratos con igual carga, ya que, al formar complejo con el contraión, cada uno presentará una hidrofobicidad distinta que determinará su tiempo de retención. Por tanto, puede ser una cromatografía líquido-líquido o líquido-sólido.

- Cromatografía de exclusión. La separación es debida a un mecanismo físico y depende sólo del tamaño de las moléculas, ya que la fase estacionaria es un sólido poroso cuyos poros presentan un diámetro semejante al de algunas de las moléculas a separar. Las moléculas demasiado gruesas son excluidas de la fase estacionaria en primer lugar; las que pueden penetrar en los poros eluyen posteriormente. Puede ser considerada una cromatografía líquido-líquido o líquido-sólido.

Como en cualquier tipo de cromatografía, las separaciones por HPLC se basan en la distinta distribución de los compuestos entre la fase estacionaria (partículas sólidas que recubren la parte interna de la columna) y la fase móvil (fase líquida constituida por uno o más solventes), de acuerdo con su mayor o menor afinidad por éstas.

Existen tres tipos de desarrollo cromatográfico:

- 1.- Elución
- 2.- Análisis frontal
- 3.- Desplazamiento

1.- Elución

La columna es impregnada con la fase móvil; posteriormente se añade la solución problema, y, seguidamente, fase móvil de forma continuada. Los solutos migran más rápidamente cuanto menor es su afinidad por la fase estacionaria y mayor por la fase móvil.

Es el desarrollo empleado en HPLC y cromatografía de gases.

2.- Análisis frontal

En primer lugar se impregna la columna con la fase móvil, añadiendo posteriormente una mezcla de soluto más fase móvil de forma continuada.

Así, sólo obtendremos puro el compuesto que eluya en primer lugar; el resto serán mezclas. Por tanto, sirve como técnica preparativa pero no analítica.

3.- Desplazamiento

Se necesita una fase estacionaria que interaccione bien con los solutos. Se impregna bien la fase estacionaria con fase móvil; se adiciona el soluto y después más fase móvil. Seguidamente se añade, de forma continuada, fase móvil más un agente desplazante, el cual entra en competición con los compuestos por los lugares de la fase estacionaria, según su afinidad por estos sea mayor o menor que la del soluto.

Este mecanismo es el que se produce en las columnas de intercambio iónico.

En cromatografía líquida de alta resolución, el desarrollo es casi exclusivamente por elución, de manera que para cada compuesto eluido se obtiene un pico simétrico y gaussiano que queda reflejado en el cromatograma.

La distribución de cada soluto entre las fases móvil y estacionaria se caracteriza, para un sistema cromatográfico dado, por el coeficiente de distribución (o coeficiente de partición) K:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s: concentración de soluto en la fase estacionaria

C_m: concentración de soluto en la fase móvil

Parámetros en Cromatografía Líquida de Alta Resolución

t_R : tiempo de retención. Es el tiempo que tarda uno de los solutos en eluir del sistema cromatográfico

t'_R: tiempo de retención corregido

$$t'_R = t_R - t_0$$

t₀ : tiempo de retención de una sustancia que no interacciona en absoluto con la fase estacionaria

$$t_0 = \frac{L}{V}$$

L: longitud de la columna

V: velocidad de la fase móvil

Conociendo el flujo de la fase móvil (φ), definimos el volumen de retención (volumen de fase móvil necesario para eluir cada compuesto):

$$V_R = t_R \times \varphi = t_R \times v \times s$$

v : velocidad lineal de la fase móvil

s : sección de la columna

Además, V_R está ligado directamente al coeficiente de distribución, K , por la relación:

$$V_R = V_m + (K \times V_s)$$

siendo V_s el volumen de la fase estacionaria y V_m el volumen de la fase móvil contenidos en la columna.

K' es el denominado Factor de Capacidad, el cual mide la capacidad de retención de la columna y es definido como la relación existente entre la cantidad de soluto en la fase estacionaria y la fase móvil.

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

Sustituyendo en las relaciones anteriores:

$$K' = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Por lo tanto, el tiempo de retención está ligado al factor de capacidad:

$$t_R = t_0 (1 + K')$$

Sustituyendo por el valor de t_0

$$t_R = (1 + K') \times \frac{L}{V}$$

*Selectividad de la columna

Nos indica si la separación obtenida es buena o no, y caracteriza la distancia que separa las cimas de dos picos consecutivos:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

ya que t_0 y V_m no dependen de las características de la columna.

* Resolución

$$R = \frac{\frac{t'_{R2} - t'_{R1}}{(w_2 + w_1)}}{2}$$

w: ancho de la base del pico

Nos interesa obtener una resolución lo mayor posible.

$$R = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{K'_2}{(1 + K'_2)} \times \frac{\sqrt{N_2}}{4}$$

N es la eficacia de una columna, y es igual al número de platos teóricos (número de lugares en la columna donde se produce un intercambio). Interesa que el número de platos teóricos sea elevado, ya que así habrá mayor intercambio y, por lo tanto, mejor separación.

$$N = 5.5 \times \left(\frac{t_R}{\delta}\right)^2$$

δ : anchura del pico a media altura

La altura del plato teórico (H) es la porción de columna, medida en mm, necesaria para que se produzca un intercambio.

$$H = \frac{L}{N}$$

La altura reducida (h) se emplea para comparar:

$$h = \frac{H}{d}$$

d : diámetro de partícula de la fase estacionaria

h = 2 columna muy buena

h > 3 cambio de columna

Relacionando todos los parámetros cromatográficos principales:

$$R_s = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha}$$

El primer término indica la influencia de la selectividad (α).

El segundo término indica la influencia del factor de capacidad (K').

El último término indica la influencia de la eficacia de la columna (N_2).

Por lo tanto, para mejorar una separación podemos influir sobre, al menos, uno de estos factores.

Optimización de las condiciones de análisis

Después de realizar una serie de ensayos preliminares se pasa a optimizar las condiciones experimentales.

Lo ideal es obtener una resolución elevada en un tiempo corto, aunque estas condiciones son contradictorias. La resolución se puede intentar aumentar por distintas vías:

- Aumentando la longitud (L) de la columna
- Disminuyendo el diámetro de las partículas

Son numerosos los trabajos realizados poniendo a punto métodos experimentales para la separación de flavonoides, fundamentalmente en fase inversa.

HPLC de flavonoides en el Género *Sideritis*

La aplicación de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia al análisis de compuestos fenólicos ha constituido un hito de gran importancia, habiéndose publicado varias revisiones bibliográficas sobre el tema, así como sistemas cromatográficos que permiten separar un elevado número de compuestos.

En la actualidad, la HPLC es una técnica habitual en el análisis de flavonoides, y para su aplicación correcta deben considerarse tres parámetros fundamentales como son las características de las fases móvil y estacionaria y del tipo de detección.

*** Fases estacionarias**

Para la separación de flavonoides por HPLC se han utilizado sobre todo columnas de acero inoxidable rellenas con gel de sílice modificada mediante la unión de organosilanos a los grupos hidroxilo de la superficie de dicha sílice, conocidas como columnas de fase inversa o reversa.

Los organosilanos más empleados son el octadeciltriclorosilano, octiltriclorosilano y pentilclorosilano, y, fundamentalmente, el primero de ellos. También se ha empleado triacetato de celulosa como fase estacionaria para la separación de mezclas de flavanonas racémicas.

También se han empleado columnas con relleno de fase apolar (columnas de acero inoxidable rellenas con gel de sílice: fase normal o directa), aunque su utilidad está limitada a la separación de agliconas flavonoideas de baja polaridad como flavonas polimetoxiladas, isoflavonas y biflavonoides, ya que si los compuestos son más polares, se pueden producir retenciones irreversibles.

Sin embargo, se pueden realizar buenas separaciones en fase normal previa acetilación de la muestra; aunque esto supone una derivatización previa al análisis, se reduce el tiempo de análisis y se abarata el coste al poder emplearse una elución isocrática con más facilidad que en el caso de fase inversa.

Para la separación de flavonoides en fase normal se han utilizado columnas Lichrosorb Si 60.

*** Fases móviles**

La elección de la fase estacionaria condiciona enormemente la fase móvil. Las separaciones en fase normal con acetilación previa de la muestra requieren el empleo de una fase móvil formada por un disolvente extremadamente apolar, modificado por

la adición de pequeñas cantidades de otro u otros disolventes orgánicos de mayor polaridad. Se han propuesto como disolvente base benceno o iso-octano, y como modificadores, acetonitrilo, agua o metanol.

La separación en fase reversa exige el empleo de una fase móvil de alta polaridad, lo que se consigue utilizando agua bidestilada y desionizada como disolvente base. A éste se le incorpora un modificador orgánico y, en general, un modificador ácido que mejora la separación y evita la formación de colas en los picos del cromatograma. El modificador orgánico más utilizado es el metanol, aunque también se han empleado acetonitrilo, tetrahidrofurano, etanol o acetato de etilo y etanol.

El pH del eluyente se suele rebajar con ácido acético, aunque también se han empleado ácido fosfórico o ácido fórmico.

En general, la separación por fase inversa se lleva a cabo mediante un gradiente de elución durante el cual se va incrementando el porcentaje de modificador orgánico en la fase móvil, bien durante todo el análisis o combinándolo con un período de elución isocrática.

La siguiente tabla recoge los rellenos de columna en fase inversa más utilizados para el análisis de compuestos flavónicos junto con la fase móvil empleada para cada uno de ellos.

COMPUESTO SEPARADO	COLUMNA	TEMPERA	FASE MÓVIL
<i>Flavonas simples</i>			
Quercetina, Kaempferol y compuestos relacionados	Vidac 101SC	-	Hexano-cloroformo (1:1)→ metanol-cloroformo-ác.acético (50:50:1)
Isoflavonoides	Merckosorb SI 60	-	Hexano-tetrahidrofurano (2:1) Eter diisopropílico
Eteres de flavonas	Pellosil HC	-	Eter diisopropílico-metanol (92:8)
Flavanonas-chalconas	Pellidon	-	Metanol-agua (3:1)
Hesperitina y hesperidina	μBondapak C-18	-	Fosfato potásico dihidrogenado 0.03M (pH 4.8) con 10 de metanol 100 %
Flavonoides	μBondapak C-18	-	Metanol-agua-ác.acético (30:63:5)
Isoflavonas	Partisil 10 ODS	-	Agua-acetonitrilo (4:1)
Flavanonas-chalconas	Pellidon	16°C 60°C	Agua-metanol (40:60) Agua-metanol (60:40)
<i>Glicósidos de flavonoides</i>			
Glicoflavonas isoméricas	LiChrosorb NH ₂	-	Acetonitrilo-agua (1:9→9:1)
Glicoflavonas	Zorbax ODS	50°C	Etanol-ác. fosfórico 0.1M (20:80→100:0)
Naringina y rutinósido de naringenina	μBondapak C-18	-	Acetonitrilo-agua (20:80)
Glicósidos de flavonoles	μBondapak C-18	-	Metanol-agua-ác.acético (30:70:5)

*** Detección**

La detección de flavonoides en HPLC se ha realizado principalmente por espectrofotometría UV/VIS, aprovechando la intensa absorción que presentan estos compuestos en esta zona del espectro; esto, unido a la elevada sensibilidad de los detectores existentes, permite el análisis de muestras que contengan cantidades muy pequeñas de estas moléculas.

La longitud de onda empleada debe ser compatible con el eluyente utilizado (éste debe ser invisible a la misma), y la adecuada para que los sustratos presenten una sensibilidad lo más elevada posible.

Para flavonoides, las longitudes de onda más empleadas son aquellas entre 250 y 280 nm, habiéndose utilizado también las comprendidas entre 335 y 375 nm, y, más concretamente, entre 340 y 360 nm, por ser útiles también para otros compuestos fenólicos.

Aunque la detección se suele realizar a una única longitud de onda, se ha realizado también de forma simultánea a dos, ya que se considera que este análisis permite realizar la detección de dos sustancias cuyos picos se solapan en base a la distinta extinción molar que presenten a una y otra longitud de onda. Esta metodología requiere el empleo de patrón interno, pero resulta muy interesante de cara al análisis cuantitativo.

También se han desarrollado detectores de longitud de onda variable (detectores Diodo-array) que permiten obtener el espectro de absorción de las sustancias separadas.

Otra posibilidad de detección, de gran utilidad, es el acoplamiento de un espectrómetro de masas, debido a su elevada sensibilidad.

Como conclusión, podemos decir que para el análisis de flavonoides por HPLC se emplean columnas de fase inversa, normalmente ODS, con una fase móvil formada por agua, metanol y/o acetonitrilo, con un modificador ácido, fundamentalmente ácido acético, y un detector UV/VIS.

II.3.3.6. Espectroscopía UV/VIS

Es la técnica más utilizada para la detección de flavonoides, aprovechando la intensa absorción que presentan estos compuestos en esa zona del espectro. Esto, unido a la elevada sensibilidad de los detectores existentes, permite el análisis de muestras que contengan cantidades muy pequeñas de estos compuestos (0-1 mg de flavonoide).

Las longitudes de onda más adecuadas, de acuerdo con su absorción, son las comprendidas entre 250 y 280 nm y entre 335 y 375 nm, teniendo en cuenta que los disolventes a emplear deben ser transparentes, es decir, que no presenten absorción a estas longitudes de onda. Así, el benceno dará problemas si la detección se realiza a longitudes de onda inferiores a 300 nm.

Normalmente se realiza la detección a una única longitud de onda, aunque en ocasiones se ha realizado de forma simultánea a dos longitudes de onda, por ejemplo a 275 y 320 nm. Esta metodología precisa el empleo de un patrón interno, pero es interesante a la hora de realizar análisis cuantitativos.

Con los nuevos detectores de tipo diodo-array (los cuales realizan un barrido entre las longitudes de onda seleccionadas, midiendo la absorción de las sustancias a dichas longitudes), es posible obtener el espectro de absorción característico de la sustancia problema.

Con la espectroscopía UV/VIS es posible tanto identificar el tipo de flavonoide (flavona, flavonol...) como su patrón de oxigenación. La presencia de grupos hidroxilo fenólicos se pone de manifiesto al añadir distintos reactivos como metóxido sódico, acetato sódico, cloruro de aluminio, ácido clorhídrico y ácido bórico a la solución de la sustancia

(realizada fundamentalmente en metanol y, con peores resultados, en etanol) y observando los cambios en los picos de absorción. Indirectamente también sirve para determinar la localización de un azúcar o grupo metilo unidos a un resto fenólico.

Para un análisis cuantitativo se emplea la relación obtenida de la Ley de Lambert-Beer:

$$A = E \times c \times d$$

A: absorbancia leída por el instrumento

E: coeficiente de extinción molar

c: concentración molar del flavonoide

d: longitud de la célula del detector en cm

El espectro típico de flavonoides consiste en dos bandas de absorción máxima entre 240-285 nm (banda II) y 300-550 nm (banda I). La posición exacta y la intensidad relativa de estos máximos nos permite conocer la naturaleza y patrón de oxigenación del flavonoide.

Es muy extensa la bibliografía que recoge los espectros típicos de multitud de flavonoides, así como los cambios en ellos producidos por distintas sustituciones en su núcleo y las claves para su identificación (Markham, 1982; Harborne, 1988)

II.3.3.7. Espectroscopía IR

Los compuestos que poseen una estructura química compleja y semejante, presentan espectros característicos al infrarrojo. Las vibraciones de la molécula producen una serie de bandas de absorción de energía inferior a 1500 cm^{-1} y cuyas posiciones son características de cada molécula.

Al realizar un espectro aparece una región por encima de 1500 cm^{-1} con bandas de absorción correspondientes a determinados grupos funcionales, y otra por debajo de esta frecuencia que contiene la banda característica del compuesto de que se trate y no de ningún otro. Esta última banda es denominada "Huella dactilar".

En el caso de flavonas, flavonoles y flavanonas, las bandas más características que aparecen en el espectro IR son las debidas a los grupos carbonilo e hidroxilo de la molécula, así como a determinadas sustituciones en el núcleo fundamental.

Existe una amplia bibliografía sobre el fundamento de esta técnica espectroscópica, así como su aplicación a la identificación de flavonoides.

II.3.3.8. Espectrofotometría de masas

Se basa en la producción de iones a partir de la muestra a analizar, seguida de una separación de los mismos de acuerdo con la relación Peso molecular/unidad de carga (m/Z). El registro de las masas y la abundancia de los distintos iones originados se denomina espectro de masas.

Sus principales aplicaciones son la determinación de pesos moleculares, establecimiento de la distribución de los sustituyentes entre los anillos A y B y determinación de la naturaleza y localización de los azúcares en C- y O- glicósidos.

Una ventaja fundamental de esta técnica es la pequeña cantidad de muestra necesaria para el análisis (submiligramos), siendo prácticamente el único método válido cuando se dispone de muy pequeña cantidad de la misma.

El espectro de masas de un flavonoide consiste en una serie de señales, cada una de las cuales corresponde a un fragmento del flavonoide original producido por el impacto de electrones en el espectrofotómetro. Las señales se recogen como una serie de líneas o de

forma numérica y son ordenadas según su relación m/Z . La intensidad de las señales es proporcional a la cantidad de especies cargadas producidas por el impacto electrónico.

Un requisito indispensable es que el flavonoide sea suficientemente volátil en el alto vacío formado dentro del espectrómetro. La mayoría de las agliconas son suficientemente volátiles a 100-230 °C; las temperaturas más elevadas son necesarias para las más polares (polihidroxi flavonas y flavonoles). Glicósidos, antocianos y biflavonoides no son suficientemente volátiles, por lo que deben sufrir derivatizaciones previas como permetilación, perdeuteración o trimetilsililación.

Las reglas generales de interpretación de la fórmula molecular, tipo y número de sustituciones en los tres anillos del esqueleto y, en algunos casos, la localización exacta de estas sustituciones, son tratadas con extensión por Markham, 1982.

La espectrofotometría de masas de desorción de campo (*Field Desorption-FD*) es la primera técnica de ionización usada para el estudio de compuestos termolábiles, y ha sido aplicada al estudio de los flavonoides por Schulten y Games, 1974, Zapesochneya y col., 1984 y Domon y Hostettmann, 1985.

Una tercera técnica es la espectroscopía de masas por bombardeo atómico rápido (*Fast Atomic Bombardement- FAB*), utilizable para átomos neutros. La muestra es solubilizada en una matriz polar, por ejemplo glicerol, y depositada en un recipiente de cobre que es bombardeado por átomos energizados, induciendo desorción e ionización.

La espectrofotometría de masas ha sido utilizada en numerosos trabajos para la determinación de estructuras de flavonoides aislados del Género *Sideritis*, como el caso de Barberán y col., 1985a y 1985b, y Fernández y col., 1988.

II.3.3.9. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Cuando se somete una molécula a la acción de un campo magnético, ciertos núcleos como ^1H ó ^{13}C , con carga positiva y movimiento de giro, se comportan como imanes, tendiendo a orientarse según dos direcciones posibles; la más estable es aquella en la que el momento magnético nuclear está orientado en la misma dirección que el campo magnético.

La RMN cuantifica la energía necesaria para orientar los núcleos en contra de dicho campo, energía que se registra en valores de desplazamiento químico δ o partes por millón (ppm).

Por lo tanto, esta técnica permite determinar el número, naturaleza y ambiente estructural que rodea a los átomos de Hidrógeno o Carbono de una molécula.

a) Espectroscopía de resonancia magnética de carbono (^{13}C -MNR)

Proporciona información sobre el carbono principal de la molécula, aplicándose para establecer el número total de átomos de carbono, el número de carbonos oxigenados del núcleo de flavonoide y el número de carbonos en la molécula de azúcar. También permite identificar el o los azúcares unidos como C- u O- heterósidos, determinar las uniones interglucosídicas y el lugar de los enlaces con el carbono (en C-glicósidos, biflavonoides, etc.).

No presenta una sensibilidad superior a la ^1H -RMN, pero es complementaria a ésta. Las modernas técnicas de RMN y Fourier Transform (FT) permiten medir espectros de protones en muestras menores de unos pocos microgramos, mientras el espectro de ^{13}C todavía requiere una cantidad superior a 5 mg (Markham y col., 1982).

Los dos factores a tener en cuenta para la elección del solvente son la solubilidad de la muestra y la posición de las resonancias de carbono del solvente. Normalmente se utilizan cloroformo deuterado (CDCl_3), dioxano, acetona hexadeuterada

$((\text{CD}_3)_2\text{CO})$, dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-d_6), óxido de deuterio (D_2O) y sus combinaciones.

Las resonancias se expresan normalmente en partes por millón (ppm).

Es muy útil para examinar mezclas complejas de heterósidos de flavonoides.

b) Espectroscopía de resonancia magnética de protón ($^1\text{H-RMN}$)

Informa sobre el ambiente estructural de cada protón. Sus aplicaciones típicas son la definición del patrón de oxigenación de los tres anillos, determinación del número y posición de los grupos metoxilo, distinción de isoflavonas, flavanonas y dihidroflavonoles, determinación del número de azúcares presentes (así como su unión en α o β) y detección de la cadena hidrocarbonada unida como C-CH_3 y restos prenilo.

Markham, 1982, expone tanto los principios de esta técnica espectroscópica como los solventes y cantidad de muestra a emplear, así como la interpretación de los espectros obtenidos.

Barberán y col., 1985a y 1985b y Fernández y col., 1988, utilizaron ambos tipos de espectroscopía de resonancia magnética para la determinación de las estructuras de varios flavonoides aislados del Género *Sideritis*, entre ellos luteolina, cirsilinol y apigenina.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- MATERIAL VEGETAL

Se han recolectado dieciséis especies del Género *Sideritis*.

De cada una de las especies objeto de estudio, se depositó un ejemplar en el herbario M.A.F. del Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia, UCM.

La tabla 3.1 recoge los nombres de las especies, así como el lugar y fecha de su recolección y número asignado en el herbario M.A.F. a las mismas.

Todas las muestras se desecaron a temperatura ambiente, procediéndose después a su pulverización y almacenaje.

TABLA 3.1 ESPECIES DEL GÉNERO *SIDERITIS* ESTUDIADAS

ESPECIE	SECCIÓN	SUBSECCIÓN	M.A.F.	LUGAR RECOLECCIÓN	FECHA RECOLECCIÓN
<i>S. foetens</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Arborescens</i>	139.030	Peñarrodá, Sierra Gádor (AL)	16-5-90
<i>S. luteola</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Arborescens</i>	139.042	Rambla de Aulago, Puente Navarro (AL)	15-5-90
<i>S. almeriensis</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Flavovirens</i>		Las Negras (AL)	27-4-90
<i>S. hirsuta</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Hirsuta</i>	139.119	De Bacares a la Tetica de Bacares (AL)	5-7-90
<i>S. leucantha</i> var. <i>serratifolia</i>	<i>Sideritis</i>	---	139.035	Peñarrodá, Sierra Gádor (AL)	16-5-90
<i>S. biflora</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Leucantha</i>	139.041	Llanos de Lucainena de las Torres (AL)	15-5-90
<i>S. leucantha</i> ssp. <i>incana</i> var. <i>meridionalis</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Leucantha</i>	139.034	El Pinar de Védar (AL)	15-5-90
<i>S. bourgeana</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Leucantha</i>		Montealegre-Fuenteálamo (AB)	27-7-88
<i>S. pusilla</i> ssp. <i>almeriensis</i>	<i>Sideritis</i>	---	139.039	Rambla de Huéchar, Sierra Gádor (AL)	15-5-90
<i>S. ibanyezii</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Flavovirens</i>	139.040	Sierra del Viento, Lorca (MU)	17-5-90
<i>S. pusilla</i> ssp. <i>pusilla</i> var. <i>granatensis</i>	<i>Sideritis</i>	---	139.038	Estribaciones de Sierra Alhamilla (AL)	15-5-90
<i>S. leucantha</i> var. <i>incana</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Leucantha</i>	139.036	Carretera de Vélez Rubio a Baza (AL)	5-7-90
<i>S. cillensis</i>	<i>Sideritis</i>	---		Cillas (GU)	8-88
<i>S. pusilla</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Flavovirens</i>	139.043	Cuevas de Almanzora (AL)	27-4-90
<i>S. glauca</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Gymnocarpae</i>	139.032	Sierra de Orihuela (A)	4-90
<i>S. incana</i> ssp. <i>incana</i>	<i>Sideritis</i>	<i>Gymnocarpae</i>		Bicorp (V)	27-7-88



S. cillensis



■ **Madrid**

S. incana ssp. incana



S. bourgeana



★
S. glanca

■ **Alicante**

Sevilla



Granada



★ *S. incana var. incana*

S. pusilla ★

S. hirsuta ★

★ *S. ibanyezii*

S. biflora

★ *S. almeriensis*



S. Euteola

★ *S. pusi. ssp. pusi.*

S. foetens



S. inc. ssp. inc.

S. pusi. ssp. almeriensis



S. inc. ssp. inc.

var. serratilolia var. meridio.

var. granatensis

Cadiz ■

III.2.- METODOLOGÍA ANALÍTICA

III.2.1.- Extracción, aislamiento y purificación

Para la extracción de los compuestos flavónicos de todas las especies en estudio, se ha escogido uno de los métodos revisados de extracción por disolventes de polaridad creciente.

La ventaja de realizar un proceso de extracción de este tipo reside en conseguir la separación de los distintos principios activos del vegetal según su polaridad.

Las muestras de las especies, convenientemente desecadas y pulverizadas, fueron sometidas a extracción por percolación en frío. Se comenzó con un disolvente apolar, hexano; una vez agotada la droga, el marco se somete a nuevas extracciones. En primer lugar se empleó una mezcla etanol: agua (70:30) también en percolador.

El extracto hidroalcohólico se concentró en un rotavapor a presión reducida hasta eliminación de todo el etanol. El extracto acuoso resultante se volvió a extraer en ampolla de decantación con disolventes orgánicos de polaridad creciente : éter etílico, acetato de etilo y butanol. Así se obtuvieron los otros cuatro extractos: etéreo, acetato de etilo, butanólico y el restante extracto acuoso ya agotado.

Al utilizar como primer disolvente el hexano, conseguimos eliminar del marco aquellos compuestos apolares (fundamentalmente resinas, aceites esenciales...) que pueden interferir en el momento de extraer los flavonoides. En el extracto hexánico encontraremos, si los hay, los flavonoides de excreción del vegetal, es decir, aquellos flavonoides más apolares.

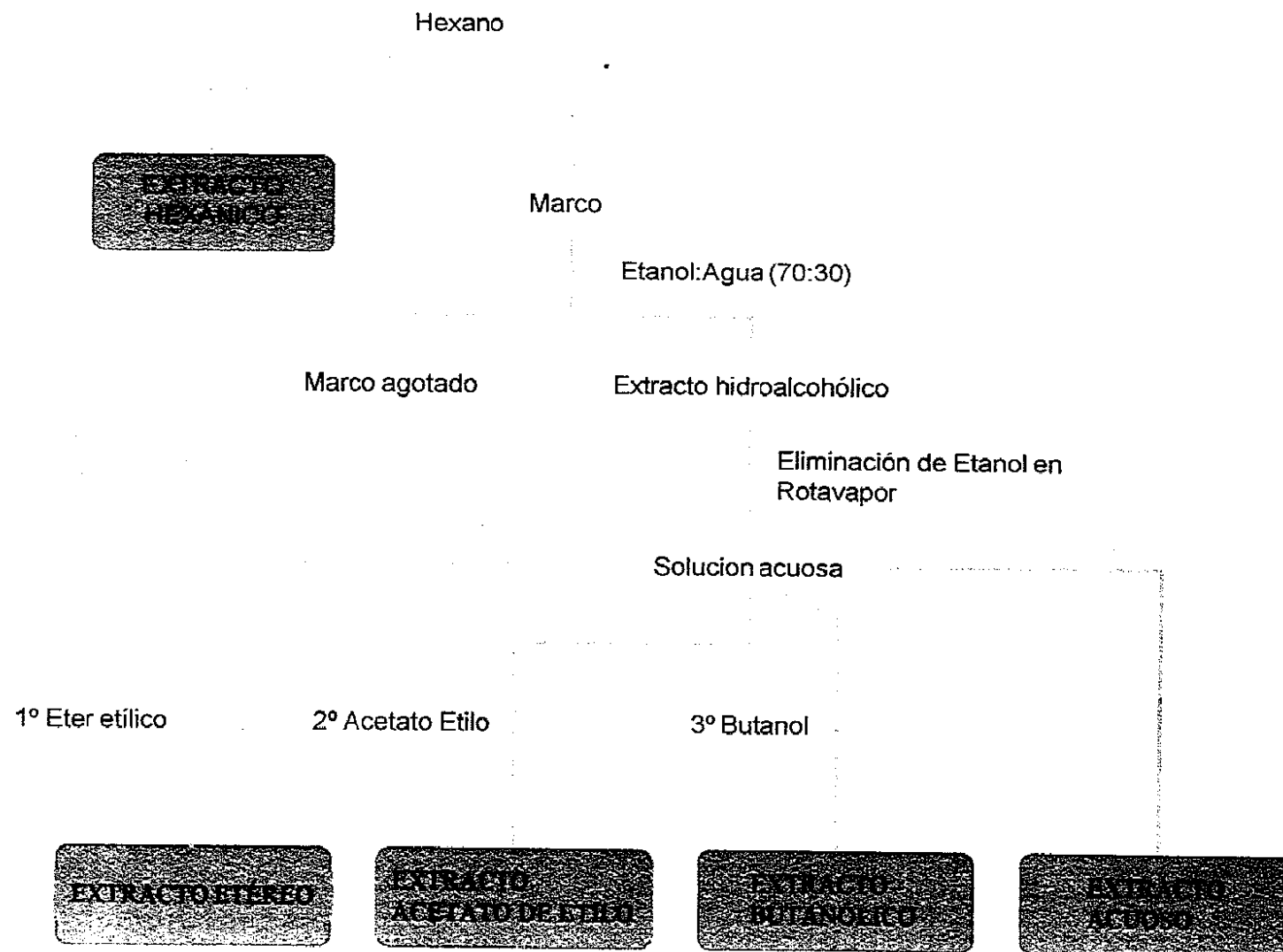
La extracción de la solución acuosa resultante tras la eliminación del etanol del extracto hidroalcohólico, en ampolla de decantación con disolventes de polaridad creciente, permite obtener por separado los distintos compuestos flavónicos de la planta. Así, en el

extracto etéreo encontraremos flavonoides de polaridad media (fundamentalmente geninas); en el extracto acetato de etilo, aquellos flavonoides de polaridad algo superior (mono- o diglicósidos), mientras que en los extractos butanólico y acuoso finales residirán los flavonoides más polares (flavonoides polihidroxilados y otros heterósidos).

De esta manera conseguimos una separación secuencial de los distintos compuestos flavónicos, lo cual facilita su posterior estudio.

Todos los extractos se concentraron a sequedad en rotavapor a presión reducida y a una temperatura entre 30°C y 50°C.

DROGA PULVERIZADA



III.2.2.- Técnicas analíticas empleadas

III.2.2.1.- CCF

Los extractos preparados de las especies fueron sometidos a estudio por cromatografía en capa fina como técnica previa para analizar la presencia de flavonoides en ellos.

Tras la revisión de las Fases móviles utilizadas para CCF de compuestos flavónicos, se escogieron:

Benceno: Metanol: Acido acético (45:3:2)

Acetato Etilo: Acido fórmico: Acido acético: Agua
(100:11:11:27) y (100:11:11:10)

Benceno: Piridina: Acido fórmico (72:18:10)

Butanol: Acido acético: Agua (40:10:50), fase superior (BAW)

Como fase estacionaria se emplearon cromatofolios de Silicagel 60 con indicador de fluorescencia a 254 nm, de 20 x 20 cm.

Como revelador se eligió la observación a la luz UV (255 y 360 nm) antes y después de someter las placas a vapores de amoníaco. Una vez observadas se emplearon NP/PEG y AlCl_3 .

En los casos en que fue necesario, se realizó una hidrólisis en placa para el estudio de los azúcares del compuesto inicial. Dicha hidrólisis se llevó a cabo según la técnica propuesta por Karting: una cubeta conteniendo 1 cm de altura de HCl concentrado se calienta a 100°C en estufa durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se introduce la placa en su interior y se mantiene durante 20 minutos a temperatura ambiente o a 100°C, dependiendo de la naturaleza de la unión a hidrolizar.

Se emplearon cuatro patrones de azúcares:

➤ (+) glucosa, D (-) xilosa, L (+) rhamnosa y D (-) arabinosa.

Como Fase Estacionaria se emplearon placas de gel de sílice 60 F254, 20 cm

20 cm Merck

La Fase Móvil elegida fue:

Acetato de etilo: Acido acético: Metanol: Agua (60:15:15:10)

El revelador empleado fue una solución de Ftalato de p-anisidina. Tras rociar las placas con el mismo, éstas se introducen en la estufa a 120°C durante 10 minutos.

III.2.2.2.- HPLC

Una vez confirmada la presencia de flavonoides en los extractos por CCF, estos pasaron a ser analizados por HPLC.

Se emplearon dos equipos de cromatógrafos líquidos de alta resolución:

* Varian 500 con inyector automático Waters WISP 710B e integrador 3390A de Hewlett-Packard.

* Varian bomba 2510 HPLC; base de datos Varian DS654 y un detector diodo array 9065 Polychrom de longitud de onda variable.

Utilizamos dos columnas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de fase inversa:

* Columna analítica Hewlett-Packard Hypersil ODS 200x4,6 mm, 5µm

* Columna semipreparativa Tecknochroma Hypersil ODS 250x7 mm, 5µm

Para optimizar la Fase móvil, se realizaron una serie de ensayos. Inicialmente se emplearon las siguientes condiciones de análisis:

- Solvente A: Acetonitrilo
- Solvente B: Agua: Acido fórmico (52:3)

con una elución isocrática de A:B en proporción 9:1 durante 20 minutos

- Flujo: 0,7 ml/min
- Detección a 360 nm

Sin embargo, la resolución no resultó satisfactoria, por lo cual se aumentó la proporción de acetonitrilo hasta un 95 %.

No todos los picos detectados a 360 nm son flavonoides, por lo cual se decidió modificar la longitud de onda de detección a 254 nm.

Después de repetidos análisis comprobamos que el ácido fórmico, utilizado como modificador ácido de la fase móvil, presenta una elevada absorción al UV e interfiere en los espectros de los picos del cromatograma. Por ello decidimos sustituirlo por el ácido acético, ensayándose el análisis con distintas cantidades del mismo:

- 1.- Solvente A: Agua: Acido acético 1%
Solvente B: Acetonitrilo

en gradiente lineal de A:B desde 70:30 hasta 30:70 en 20 minutos, con un flujo de 1 ml/min

Los picos obtenidos presentan bastante cola.

- 2.- Solvente A: Agua: Acido acético 2%
Solvente B: Acetonitrilo

en gradiente lineal de A:B desde 70:30 hasta 30:70 en 20 minutos, con un flujo de 2 ml/min

La resolución obtenida es muy buena, por lo cual se conserva esta proporción Agua:Ac. acético.

Se ensayaron distintas proporciones en el gradiente de la fase móvil, llegándose a obtener la que ofrece una mejor resolución del cromatograma:

Gradiente lineal durante los 10 primeros minutos desde el 70% hasta el 50% de A; en el minuto 11 la proporción de A disminuye hasta el 20% y se mantiene en elución isocrática hasta el minuto 20. El tiempo de recuperación de las condiciones iniciales del análisis es de 10 minutos.

Por lo tanto, las condiciones de análisis escogidas finalmente son las siguientes:

A)- Columna analítica Hewlett-Packard Hypersil ODS 200 x 4.6mm, 5 μ m

- Fase móvil:

Solvente A: Agua: Ac.acético (2%)

Solvente B: Acetonitrilo

- Tiempo de análisis: 20 min con una elución en gradiente en primer lugar y, posteriormente, lineal.

Se dispone de diez compuestos patrones de flavonoides:

- 1.- Isoscutelareín-7-O- α -D-glucósido
- 2.- Luteolina
- 3.- Hypolaetina-8-glucósido
- 4.- Crisoeriol
- 5.- Apigenina
- 6.- Sideritoflavona
- 7.- Xantomicrol
- 8.- Gardenina-D
- 9.- 8-metoxicirsilineol
- 10.- Desmetilnobiletina

La identificación de los compuestos flavónicos presentes en los distintos extractos se llevó a cabo por comparación con los t_R de los patrones de flavonoides puros y de los espectros correspondientes. Para evaluar la riqueza de los picos, estos fueron monitorizados con el detector diodo array (200-400 nm). Los espectros correspondientes al inicio, ápex y final del pico fueron normalizados y superpuestos, considerándose puros cuando los tres coincidían exactamente (match factor >99). Por extrapolación de la curva de calibrado concentración/área de los mismos se procedió a la cuantificación de los compuestos identificados.

Para obtener la concentración de solución a inyectar más adecuada, atendiendo a las características del equipo cromatográfico, se realizaron varias pruebas pesando distintas cantidades de extracto y disolviéndolas en el solvente de elección, metanol. Finalmente, se obtuvo como óptima una concentración de 1-1,5 mg/ml, por lo cual se intentó que todas las muestras preparadas se aproximaran a ella lo más posible. Estas concentraciones, en mg de extracto por ml de metanol, se recogen a continuación en la TABLA 3.1

TABLA 3.1

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto Ac de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
<i>S.foetens</i>	1.083	1.525	1.500	1.425	1.425
<i>S.luteola</i>	0.808	1.675	1.475	1.700	1.500
<i>S.almeriensis</i>	1.450	1.525	1.600	1.450	1.475
<i>S.hirsuta</i>	1.500	1.550	1.550	1.425	1.425
<i>S.leucan. var serr.</i>	0.916	1.600	1.450	1.375	1.375
<i>S.biflora</i>	0.625	1.600	1.525	1.425	1.525
<i>S.leucan. ssp inc. var.merid</i>	1.033	1.575	1.525	1.500	1.425
<i>S.bourgeana</i>	0.750	1.675	1.475	1.325	1.500
<i>S.pus. ssp almer</i>	0.966	1.650	1.550	1.450	1.475
<i>S.ibanyezii</i>	1.062	1.525	1.475	1.450	1.500
<i>S.pusilla ssp pusi. var granatensis</i>	1.125	1.525	1.550	1.425	1.500
<i>S.leucan. var inc.</i>	1.225	1.600	1.550	1.425	1.425
<i>S.cillensis</i>	1.175	1.575	1.525	1.475	1.475
<i>S.pusilla</i>	1.125	1.575	1.575	1.425	1.550
<i>S.glauca</i>	1.150	1.450	1.500	1.425	1.500
<i>S.incana ssp inc.</i>	1.400	1.450	1.475	1.450	1.500

III.2.2.3.- Espectroscopía UV/VIS

Los compuestos flavónicos detectados cuya identificación no fue posible por HPLC fueron aislados mediante HPLC semipreparativo y se realizó su espectro de absorción UV/VIS siguiendo la técnica correspondiente.

III.2.2.4.- Espectroscopía de RMN

El espectrómetro utilizado fue un Bruker 250 AC (250 MHz, ^1H), (62.5 MHz, ^{13}C). Como solvente se empleó metanol deuterado (CD_3OD).

Del compuesto sin identificar se realizaron espectros de ^1H , de ^{13}C , experimentos bidimensionales de correlación H-H y espectros NOE de diferencia.

IV.- RESULTADOS

IV.I.- Rendimientos de los extractos

La tabla 4.1 recoge el porcentaje (en peso) de cada uno de los extractos obtenidos de las distintas especies.

TABLA 4.1

ESPECIE	Hexánico	Etéreo	Acetato de etilo	Butanól	Acuoso
<i>S.foetens</i>	0,82	2,89	0,72	0,96	4,64
<i>S.luteola</i>	1,16	3,65	0,78	0,91	2,98
<i>S.almeriensis</i>	1,00	0,50	1,00	0,25	4,25
<i>S.hirsuta</i>	3,60	0,20	0,30	0,50	0,50
<i>S.leucantha</i> var <i>serratifolia</i>	2,40	0,50	1,10	0,50	8,60
<i>S.biflora</i>	1,00	0,50	0,50	2,00	7,80
<i>S.leucantha</i> ssp <i>incana</i> var <i>meridionalis</i>	1,50	1,00	1,50	2,50	4,50
<i>S.bourgeana</i>	0,50	1,50	1,50	6,00	4,00
<i>S.pusilla</i> ssp <i>almeriensis</i>	1,50	2,00	0,50	2,50	4,00
<i>S.pusilla</i> ssp <i>pusilla</i> var <i>granatensis</i>	1,66	2,33	3,60	2,33	4,00
<i>S.ibanyezii</i>	0,50	1,50	2,00	3,00	6,50
<i>S.leucantha</i> var <i>incana</i>	1,00	1,50	3,00	8,50	6,00
<i>S.cillensis</i>	2,00	1,50	2,00	6,50	9,50
<i>S.pusilla</i>	2,00	3,50	2,00	5,50	4,50
<i>S.glauca</i>	0,50	0,50	0,50	1,00	4,00
<i>S.incana</i> ssp <i>incana</i>	0,50	0,50	0,50	2,50	6,50

IV.I - Cromatografía en Capa Fina

Para el estudio de los distintos extractos, una pequeña cantidad de cada muestra fue disuelta en Metanol para cromatografía. Para optimizar la separación de las manchas se emplearon distintas fases móviles:

FM₁ : Benceno:Metanol:Acido acético (45:3:2)

FM₂ : Acetato de Etilo:Acido fórmico:Acido acético:Agua (100:11:11:27)

FM₃ : Benceno:Piridina:Acido fórmico (72:18:10)

FM₄ : Acetato de Etilo:Acido fórmico:Acido acético:Agua (100:11:11:10)

FM₅ : Butanol:Acido acético:Agua (40:10:50) fase superior (BAW)

Una vez desarrollado el cromatograma, las placas fueron sometidas a vapores de amoníaco y visualizadas a la luz ultravioleta. Posteriormente se revelaron con una solución de NEU (NP/PEG) o AlCl₃.

A continuación se recogen los resultados obtenidos tras el análisis de los patrones bajo las distintas fases móviles (R_f y coloración al UV después de revelar con NEU).

FLAVONOIDE	FM					COLOR TRAS NEU	
	1	2	3	4	5	254nm	366nm
Isoscut.-7-glucósido	0,00	0,12	0,01	0,45	0,60	Amarill	Oscuro
Hypolaetina 8-glucósido	0,00	0,17	0,03	0,76	0,45	Amarill	Naranj
Luteolina	0,17	0,89	0,23	1,00	0,85	Am-Nar	Oscuro
Crisoeriol	0,38	0,90	0,55	1,00	0,83	Amarill	Oscuro
Apigenina	0,35	0,92	0,51	1,00	0,84	Amarill	Oscuro
Sideritofla	0,38	0,86	0,68	1,00	0,80	Naranja	Oscuro
Xantomicrol	0,58	0,93	0,78	1,00	0,83	Oscuro	Oscuro
Gardenina D	0,64	0,92	0,79	1,00	0,80	Oscuro	Oscuro
8-MeO-cirsilineol	0,66	0,92	0,79	1,00	0,81	Oscuro	Oscuro
Desmetil-nobiletina	0,80	0,99	0,85	1,00	0,86	Naranja	Oscuro

El número de compuestos flavónicos detectados en cada especie, así como su Rf bajo las distintas Fases Móviles empleadas y la coloración obtenida tras su revelado, se recogen en las tablas 4.2 a 4.17

TABLA 4.2

<i>Sideritis foetens</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,44	Amarillo	Oscuro	
Etéreo	1	0,20	Amarillo	Oscuro	Luteolina
		0,25	Amarillo	Oscuro	
		0,39	Amarillo	Oscuro	Crisoeriol
		0,44	Amarillo	Oscuro	
	2	0,58	Oscuro	Oscuro	
		0,82	Oscuro	Oscuro	Luteolina
		1,00	Amarillo	Oscuro	Desmet.nob
	3	0,00	Amarillo	Oscuro	Isoscutel.
		0,68	Oscuro	Oscuro	
Acetato Et	1	0,25	Amarillo	Oscuro	
		0,40	Amarillo	Oscuro	Crisoeriol
		0,46	Amarillo	Oscuro	
	2	0,68	Naranja	Oscuro	
		0,71	Naranja	Oscuro	
		0,75	Naranja	Oscuro	
	4	0,28	Naranja	Naran.	
		0,33	Naranja	Naran.	
		0,39	Naranja	Naran.	
		0,43	Naranja	Naran.	Isoscutel.
		0,50	Naranja	Oscuro	
		0,63	Naranja	Verde	
		0,79	Naranja	Oscuro	Hypolaet.
Butanólico	2	0,60	Amarillo	Oscuro	
		0,66	Naranja	Oscuro	
Acuoso	2	0,55	Oscuro	Oscuro	

TABLA 4.3

Sideritis luteola

EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	-			
Etéreo	1	0,25	Amarill	Oscuro	
		0,40	Amarill	Oscuro	Crisoeriol
		0,46	Amarill	Oscuro	
	2	0,60	Oscuro	Oscuro	
		1,00	Amarill	Oscuro	Desmetilnob
	3	0,00	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,03	Oscuro	Oscuro	Hypolaetina
		0,79	Amarill	Oscuro	Gar.D u 8-MeO-cirsil
Acetato Et	2	0,71	Oscuro	Oscuro	
		0,73	Naranja	Oscuro	
		0,76	Oscuro	Oscuro	
		0,91	Amarill	Oscuro	Crisoeriol
		0,97	Amarill	Oscuro	Desmetilnob
	4	0,44	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,49	Oscuro	Oscuro	
		0,51	Oscuro	Oscuro	
Butanólico	2	-			
Acuoso	2	0,55	Oscuro	Oscuro	

TABLA 4.4

<i>Sideritis almeriensis</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,55	Oscuro	Oscuro	Xantomicrol
		0,80	Amarill	Oscuro	Desmetilnob
Etéreo	2	1,00	Amarill	Oscuro	Desmetilnob
Acetato Et	2	0,71	Oscuro	Oscuro	
		0,71	Verde	Oscuro	
		0,74	Naranja	Oscuro	
		0,76	Verde	Oscuro	
		0,83	Ama-Ver	Ama-ver	
		0,97	Naranja	Oscuro	Desmetilnob
	4	0,59	Naranja	Oscuro	
		0,62	Oscuro	Oscuro	
		0,75	Naranja	Oscuro	Hypolaetina
		0,93	Oscuro	Oscuro	Xantomicrol
		0,97	Naranja	Oscuro	Desmetilnob
Butanólico	2	0,54	Amarill	Oscuro	
		0,61	Amarill	Oscuro	
		0,64	Amarill	Oscuro	
		0,77	Oscuro	Oscuro	
Acuoso	2	0,55	Oscuro	Oscuro	

TABLA 4.5

<i>Sideritis hirsuta</i>						
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		AlCl ₃	Flavonoide
			366 nm	254 nm		
Hexánico	1	0,55	Oscuro	Oscuro		Xantomie
Etéreo	2	1,00	Amarill	Oscuro		Desmetnob
	3	0,10	Amarill	Oscuro		
		0,63	Amarill	Oscuro		
		0,91	Oscuro	Oscuro		Desmetnob
Acetato Et	2	0,69	Naranja	Oscuro		
		0,74	Naranja	Oscuro		
		0,79	Oscuro	Oscuro		
		0,86	Am-Verd	Oscuro		Luteol o Sideritof
		0,97	Naranja	Naranj		Desmetnob
	4	0,45	Naranja	Oscuro		Isoscutel
		0,57	Naranja	Oscuro		
		0,63	Oscuro	Oscuro		
		0,71	Naranja	Oscuro		
		0,75	Naranja	Oscuro		Hypolaet
		0,79	Naranja	Oscuro		
		0,90	Naranja	Oscuro		
		0,97	Naranja	Oscuro		Desmetnob
Butanólico	2	0,50	Amarill	Oscuro		
		0,52	Naranja	Oscuro		
		0,54	Amarill	Oscuro		
		0,61	Amarill	Oscuro		
		0,64	Oscuro	Oscuro		
Acuoso	2	0,51	Naranja	Oscuro	Nar	
		0,55	Oscuro	Oscuro	Amar	
		0,65	-	-	Amar	

TABLA 4.6

Sideritis leucantha var *serratifolia*.

EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		AlCl ₃	Flavonoide
			366 nm	254 nm		
Hexánico	1	0,00	Amarill	Oscuro		Isoscut o Hypolaet
		1,00	Oscuro	Oscuro		
Etéreo	2	1,00	Amarill	Oscuro		Desmetnob
	3	0,10	Amarill	Oscuro		
Acetato Et	2	0,75	Verde	Oscuro		
		0,78	Oscuro	Oscuro		
		0,81	Naranja	Naranj		
		0,86	Ama-Ver	Oscuro		Luteolina
		0,94	Verde	Oscuro		
		0,97	Oscuro	Oscuro		Gar.D u 8-MeO cirsilin
		0,98	Naranja	Oscuro		Desmetnob
	4	0,56	Naranja	Oscuro		
		0,59	Oscuro	Oscuro		
		0,69	Naranja	Oscuro		
		0,73	Amarill	Oscuro		Hypolaet
		0,78	Oscuro	Oscuro		
		0,85	Naranja	Oscuro		
		0,90	Naranja	Oscuro		
Butanólico	2	0,61	Amarill	Oscuro		
		0,66	Oscuro	Oscuro		
		0,73	Amarill	Oscuro		
Acuoso	2	0,55	Oscuro	Oscuro	Amar	
		0,65			Amar	

TABLA 4.7

<i>Sideritis biflora</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,55	Oscuro	Oscuro	Xantomicrol
		0,80	Amarill	Oscuro	Desmetilnob
Etéreo	2	0,82	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		1,00	Amarill	Oscuro	Desmetilnob
	3	0,06	Naranja	Oscuro	
		0,40	Oscuro	Oscuro	
		0,57	Oscuro	Oscuro	Crisoeriol
		0,67	Oscuro	Oscuro	Sideritofla
		0,76	Oscuro	Oscuro	Xantomicrol
		0,79	Amarill	Oscuro	Gardenina D
Acetato Et	2	0,39	Amarill	Oscuro	
		0,44	Naranja	Oscuro	
		0,46	Naranja	Oscuro	
		0,49	Naranja	Oscuro	
		0,55	Oscuro	Oscuro	
		0,61	Ver-Am	Oscuro	
		0,66	Ver-Am	Oscuro	
		0,69	Naranja	Oscuro	
		0,76	Naranja	Oscuro	
		0,90	Amarill	Oscuro	Crisoeriol
	4	0,54	Naranja	Oscuro	
		0,58	Naranja	Oscuro	
		0,63	Oscuro	Oscuro	
		0,74	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,81	Amarill	Amar	
		0,97	Amarill	Oscuro	Desmetilnob
Butanólico	5	0,13	Naranja	Naranj	

		0,37	Naranja	Oscuro	
		0,44	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,53	Naranja	Oscuro	
		0,60	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,75	Am-Ver	Oscuro	
		0,78	Naranja	Oscuro	Sideritofla
Acuoso	5	0,00	Naranja	Oscuro	
		0,13	Naranja	Naranj	
		0,50	Amarill	Naranj	

TABLA 4.8

<i>Sideritis leucantha ssp incana var meridionalis</i>					
TRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254nm	
ánico	1	0,55	Oscuro	Oscur	Xantomicrol
eo	2	1,00	Amarill	Oscur	Desmetilnob
	3	0,09	Naranja	Oscur	Hypolaetina
		0,40	Oscuro	Oscur	
		0,57	Oscuro	Oscur	Crisoeriol
		0,67	Oscuro	Oscur	Sideritofla
		0,76	Oscuro	Oscur	Xantomicrol
		0,78	Amarill	Oscur	Gardenina D
ato Et	2	0,46	Naranja	Oscur	
		0,51	Oscuro	Oscur	
		0,60	Ver-Am	Oscur	
		0,66	Ver-Am	Oscur	
		0,90	Amarill	Oscur	Crisoeriol
	4	0,56	Am-Ver	Oscur	
		0,61	Oscuro	Oscur	
		0,73	Verde	Oscur	
		0,98	Naranja	Oscur	
nólico	5	0,10	Oscuro	Naran	
		0,37	Naranja	Oscur	
		0,44	Naranja	Naran	
		0,50	Oscuro	Oscur	
		0,60	Amarill	Oscur	Isoscutelar
		0,75	Am-Ver	Oscur	

Acuoso	5	0,37	Naranja	Oscur	
		0,60	Amarill	Oscur	Isoscutelar
		0,75	Am-Ver	Oscur	

TABLA 4.9

<i>Sideritis bourgeana</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,55	Oscuro	Oscuro	Xantomierol
		0,81	Amarill	Oscuro	Desmetilnob
		0,86	Oscuro	Oscuro	
Etéreo	3	0,00	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,03	Oscuro	Oscuro	Hypolaetina
		0,06	Naranja	Oscuro	
		0,09	Naranja	Oscuro	
		0,68	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		0,71	Oscuro	Oscuro	
		0,79	Amarill	Oscuro	Gar.D u 8-MeO-cirsilin
Acetato Et	2	0,38	Amarill	Oscuro	
		0,46	Naranja	Oscuro	
		0,48	Naranja	Oscuro	
		0,49	Naranja	Oscuro	
		0,53	Oscuro	Oscuro	
		0,60	Ver-Am	Oscuro	
		0,66	Ver-Am	Oscuro	
		0,76	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		0,90	Amarill	Oscuro	Crisoeriol
	4	0,57	Naranja	Oscuro	
		0,62	Oscuro	Oscuro	
		0,74	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,82	Naranja	Oscuro	

Butanólico	2	0,12	Am-Ver	Oscuro	Hypolaetina
		0,33	Naranja	Oscuro	
		0,36	Am-Ver	Oscuro	
		0,39	Oscuro	Oscuro	
		0,49	Naranja	Oscuro	
		0,55	Oscuro	Oscuro	
		0,77	Naranja	Oscuro	Sideritofla
	5	0,16	Naranja	Oscuro	
		0,38	Naranja	Oscuro	
		0,43	Naranja	Oscuro	Hypolaetina
		0,49	Naranja	Oscuro	
		0,51	Naranja	Oscuro	
		0,54	Naranja	Oscuro	
		0,59	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,62	Verde	Oscuro	
		0,69	Am-Ver	Oscuro	
Acuoso	2	0,00	Amarill	Oscuro	
		0,36	Amarill	Oscuro	
		0,64	Am-Ver	Oscuro	
	5	0,15	Amarill	Oscuro	
		0,59	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,63	Am-Ver	Oscuro	

TABLA 4.10

<i>Sideritis pusilla ssp almeriensis</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,86	Oscuro	Oscuro	Oscuro
Etéreo	3	0,00	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,03	Oscuro	Oscuro	Hypolaetina
		0,05	Naranja	Oscuro	
		0,08	Naranja	Oscuro	
		0,10	Naranja	Oscuro	
		0,68	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		0,71	Oscuro	Oscuro	
Acetato Et	2	0,48	Naranja	Oscuro	
		0,50	Oscuro	Oscuro	
		0,60	Ver-Am	Oscuro	
		0,66	Ver-Am	Oscuro	
		0,90	Amarill	Oscuro	Crisoeriol
	4	0,47	Oscuro	Oscuro	Isoscutelar
		0,56	Oscuro	Oscuro	
		0,67	Oscuro	Oscuro	
		0,78	Oscuro	Oscuro	
Butanólico	2	0,12	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,34	Am-Ver	Oscuro	
		0,51	Naranja	Oscuro	
	5	0,14	Naranja	Oscuro	
		0,51	Verde	Oscuro	
	2	0,00	Naranja	Oscuro	
	5	0,64	Am-Ver	Oscuro	
		0,00	Oscuro	Oscuro	
		0,09	Amarill	Oscuro	
Acuoso		0,56	Oscuro	Oscuro	

TABLA 4.11

<i>Sideritis ibanyezii</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,26	Naranja	Naranj	
		0,31	Naranja	Naranj	Sideritofla
		0,40	Azul	Oscuro	
		0,46	Amarill	Oscuro	
Etéreo	3	0,40	Oscuro	Oscuro	
		0,57	Amarill	Oscuro	Crisoeriol
		0,68	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		0,76	Oscuro	Oscuro	Xantomicrol
Acetato Et	2	0,46	Amarill	Oscuro	
		0,50	Oscuro	Oscuro	
		0,52	Oscuro	Oscuro	
		0,60	Ver-Am	Oscuro	
		0,66	Amarill	Oscuro	
		0,66	Ver-Am	Oscuro	
		0,90	Amarill	Oscuro	Crisoeriol
	4	0,57	Oscuro	Oscuro	
		0,60	Oscuro	Oscuro	
		0,71	Naranja	Naranj	Hypolaetina
		0,79	Oscuro	Oscuro	Gar D u 8-MeO-cirslineol
Butanólico	2	0,13	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,38	Am-Ver	Oscuro	
		0,48	Am-ver	Oscuro	
		0,55	Verde	Oscuro	
		0,68	Amarill	Oscuro	
	5	0,14	Naranja	Oscuro	
		0,31	Verde	Oscuro	

		0,52	Amarill	Oscuro	
		0,61	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,71	Verde	Oscuro	
Acuoso	2	0,00	Naranja	Oscuro	
		0,50	Amarill	Oscuro	
		0,65	Am-Ver	Oscuro	
	5	0,00	Oscuro	Oscuro	
		0,56	Amarill	Oscuro	
		0,60	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,82	Amarill	Oscuro	Crisoeriol

TABLA 4.12

<i>Sideritis pusilla ssp pusilla var granatensis</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,00	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,01	Naranja	Oscuro	Hypolaetina
		0,31	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		0,86	Oscuro	Oscuro	Desmetilnob
Etéreo	3	0,68	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		0,76	Oscuro	Oscuro	Xantomicrol
		0,80	Oscuro	Oscuro	Gar D u 8-MeO-cirsilineol
Acetato Et	2	0,55	Oscuro	Oscuro	
		0,64	Amarill	Oscuro	
		0,90	Amarill	Oscuro	Crisoeriol
	4	0,57	Oscuro	Oscuro	Isoscutelar
		0,66	Naranja	Oscuro	
		0,76	Naranja	Oscuro	Hypolaetina
		0,80	Oscuro	Oscuro	Gar D u 8-MeO-cirsilineol
Butanólico	2	0,12	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,38	Naranja	Oscuro	
		0,43	Oscuro	Oscuro	
		0,49	Am-Ver	Oscuro	
		0,55	Oscuro	Oscuro	
		0,72	Naranja	Oscuro	
	5	0,14	Amarill	Oscuro	
		0,46	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,61	Verde	Oscuro	
		0,65	Verde	Oscuro	
		0,71	Am-Ver	Oscuro	

Acuoso	2	0,00	Naranja	Oscuro	
		0,38	Naranja	Oscuro	
		0,65	Am-Ver	Oscuro	
	5	0,00	Oscuro	Oscuro	
		0,55	Oscuro	Oscuro	
		0,59	Amarill	Oscuro	Isoscutelar

TABLA 4.13

Sideritis leucantha ssp *incana*

EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254nm	
Hexánico	1	0,64	Oscuro	Oscuro	Gardenina D
		0,81	Ver-Am	Oscuro	Desmetilnob
Etéreo	1	0,00	Amarill	Oscuro	Isoscutela
		0,04	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,11	Verde	Oscuro	
		0,16	Naranja	Oscuro	Luteolina
		0,19	Naranja	Oscuro	
		0,33	Oscuro	Oscuro	Sideritofla
		0,43	Oscuro	Oscuro	
	5	0,80	Am-Nar	Oscuro	Sideritofla
		0,85	Naranja	Oscuro	Hypolaetina
		0,87	Naranja	Oscuro	Desmetilnob
		0,89	Amarill	Oscuro	
Acetato Et	4	0,56	Naranja	Oscuro	Isoscutelar
		0,67	Naranja	Oscuro	Hypolaetina
Butanólico	2	0,12	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,47	Naranja	Oscuro	
		0,49	Naranja	Oscuro	
		0,56	Oscuro	Oscuro	
		0,71	Naranja	Oscuro	
	5	0,14	Amarill	Oscuro	
		0,39	Naranja	Oscuro	
		0,45	Naranja	Oscuro	Hypolaetina
		0,47	Naranja	Oscuro	
		0,50	Naranja	Oscuro	

		0,53	Naranja	Oscuro	
		0,56	Oscuro	Oscuro	
		0,57	Naranja	Oscuro	
		0,61	Am-Nar	Oscuro	Isoscutelar
		0,63	Am-Ver	Oscuro	
		0,67	Am-Ver	Oscuro	
		0,71	Am-Ver	Oscuro	
Acuoso	5	0,45	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,50	Naranja	Oscuro	
		0,57	Naranja	Oscuro	
		0,63	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,71	Am-Ver	Oscuro	

TABLA 4.14

<i>Sideritis cillensis</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,00	Amarill	Oscuro	Hypolaet o Isoscutelar
		0,01	Amarill	Oscuro	Hypolaet o Isoscutelar
		0,59	Oscuro	Oscuro	Xantomicrol
		0,64	Oscuro	Oscuro	Gardenina D
		0,81	Ver-Am	Oscuro	Desmetilnob
		0,87	Oscuro	Oscuro	
Etéreo	1	0,00	Amarill	Oscuro	Hypolaet o Isoscutelar
		0,04	Amarill	Oscuro	
		0,08	Verde	Oscuro	
		0,10	Verde	Oscuro	
		0,14	Amarill	Oscuro	Luteolina
		0,26	Oscuro	Oscuro	
		0,35	Amarill	Oscuro	Apigenina
		0,38	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		0,44	Oscuro	Oscuro	
	5	0,75	Naranja	Oscuro	
		0,87	Naranja	Oscuro	Desmetilnob
		0,89	Amarill	Oscuro	
		0,93	Naranja	Oscuro	
Acetato Et	4	0,55	Oscuro	Oscuro	Isoscutelar
		0,61	Oscuro	Oscuro	
		0,68	Naranja	Oscuro	
		0,71	Naranja	Oscuro	
		0,77	Naranja	Oscuro	Hypolaetina

		0,86	Amarill	Oscuro	
Butanólico	2	0,12	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,22	Naranja	Oscuro	
		0,27	Naranja	Oscuro	
		0,33	Naranja	Oscuro	
		0,43	Naranja	Oscuro	
		0,53	Verde	Oscuro	
		0,55	Naranja	Oscuro	
		0,66	Amarill	Oscuro	
		0,91	Verde	Oscuro	
	5	0,14	Amarill	Oscuro	
		0,39	Naranja	Oscuro	
		0,46	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,50	Verde	Oscuro	
		0,58	Verde	Oscuro	
		0,61	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,64	Verde	Oscuro	
		0,71	Am-Ver	Oscuro	
Acuoso	5	0,46	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,61	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,71	Am-Ver	Oscuro	

TABLA 4.15

Sideritis pusilla

EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,59	Oscuro	Oscuro	Xantomicrol
		0,65	Oscuro	Oscuro	Gar D u 8-MeO-cirsilineol
		0,88	Oscuro	Oscuro	
Etéreo	1	0,00	Amarill	Oscuro	Isoscutel o Hypolaetina
		0,04	Verde	Oscuro	
		0,08	Verde	Oscuro	
		0,10	Verde	Oscuro	
		0,14	Amarill	Oscuro	
		0,19	Naranja	Oscuro	Luteolina
		0,20	Amarill	Oscuro	
		0,33	Oscuro	Oscuro	
		0,45	Oscuro	Oscuro	
	5	0,71	Naranja	Oscuro	
		0,75	Naranja	Oscuro	
		0,80	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		0,86	Naranja	Oscuro	Desmetilnob
		0,90	Naranja	Oscuro	
Acetato Et	2	0,45	Oscuro	Oscuro	
		0,61	Am-Ver	Oscuro	
		0,69	Amarill	Oscuro	
		0,70	Amarill	Oscuro	
		0,81	Amarill	Oscuro	
		0,88	Amarill	Oscuro	Sideritofla
Butanólico	2	0,37	Am-Ver	Oscuro	
		0,41	Verde	Oscuro	

	5	0,49	Verde	Oscuro	
		0,55	Oscuro	Oscuro	
		0,14	Amarill	Oscuro	
		0,53	Am-Ver	Oscuro	
		0,57	Am-Ver	Oscuro	
		0,61	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,63	Am-Ver	Oscuro	
		0,71	Am-Ver	Oscuro	
Acuoso	2	0,00	Naranja	Oscuro	
	5	0,00	Oscuro	Oscuro	
		0,09	Amarill	Oscuro	
		0,56	Oscuro	Oscuro	

TABLA 4.16

<i>Sideritis glauca</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,00	Amarill	Oscuro	Isoscutel o Hypolaetina
		0,61	Oscuro	Oscuro	Gardenina D
		0,88	Oscuro	Oscuro	
Etéreo	1	0,00	Naranja	Oscuro	Isoscutel o Hypolaetina
		0,08	Verde	Oscuro	
	5	0,64	Naranja	Oscuro	
		0,70	Oscuro	Oscuro	
		0,89	Naranja	Oscuro	
Acetato Et	2	0,45	Oscuro	Oscuro	
		0,59	Am-Ver	Oscuro	
Butanólico	2	0,42	Oscuro	Oscuro	
		0,48	Amarill	Amar	
		0,55	Naranja	Oscuro	
		0,66	Oscuro	Oscuro	
	5	0,58	Oscuro	Oscuro	
		0,61	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,64	Oscuro	Oscuro	
		0,71	Am-Ver	Oscuro	
		0,76	Oscuro	Oscuro	
Acuoso	2	0,00	Naranja	Oscuro	
		0,40	Oscuro	Oscuro	
		0,53	Oscuro	Oscuro	
	5	0,14	Amarill	Oscuro	
		0,58	Am-Ver	Oscuro	
		0,61	Amarill	Oscuro	Isoscutelar
		0,68	Oscuro	Oscuro	

TABLA 4.17

<i>Sideritis incana ssp incana</i>					
EXTRACTO	FM	Rf	Color tras NEU		Flavonoide
			366 nm	254 nm	
Hexánico	1	0,00	Amarill	Oscuro	Isoscutel o Hypolaetina
		0,80	Oscuro	Oscuro	Desmetilnob
		0,88	Oscuro	Oscuro	
Etéreo	1	0,00	Naranja	Oscuro	Isoscutel o Hypolaetina
		0,04	Amarill	Oscuro	Isoscutel o Hypolaetina
		0,06	Verde	Oscuro	
		0,16	Verde	Oscuro	
		0,19	Amarill	Oscuro	Luteolina
	5	0,55	Naranja	Oscuro	
		0,62	Am-Nar	Oscuro	Isoscutelar
		0,75	Amarill	Oscuro	
		0,79	Amarill	Oscuro	
		0,86	Amarill	Oscuro	Desmetilnob
		0,89	Amarill	Oscuro	
		0,92	Amarill	Oscuro	
		0,95	Amarill	Oscuro	
Acetato Et	2	0,00	Naranja	Oscuro	
		0,20	Naranja	Oscuro	
		0,29	Naranja	Oscuro	
		0,35	Amarill	Verde	
		0,67	Am-Ver	Oscuro	
		0,79	Amarill	Oscuro	Crisoeriol
		0,84	Naranja	Oscuro	Sideritofla
		0,91	Naranja	Oscuro	
Butanólico	2	0,18	Amarill	Oscuro	Hypolaetina
		0,26	Naranja	Oscuro	

		0,29	Naranja	Oscuro	
		0,31	Naranja	Oscuro	
		0,38	Am-Ver	Oscuro	
		0,44	Naranja	Oscuro	
		0,53	Oscuro	Oscuro	
		0,56	Oscuro	Oscuro	
		0,91	Oscuro	Oscuro	Gar D u 8-MeO-cirsilineol
	5	0,53	Naranja	Oscuro	
		0,59	Am-Nar	Oscuro	Isoscutelar
		0,63	Naranja	Oscuro	
		0,65	Verde	Oscuro	
		0,73	Verde	Oscuro	
		0,78	Amarill	Oscuro	
		0,83	Amarill	Oscuro	Criseol
Acuoso	2	0,00	Naranja	Oscuro	
		0,50	Naranja	Naranj	
	5	0,15	Amarill	Oscuro	
		0,50	Naranja	Oscuro	
		0,54	Naranja	Oscuro	
		0,61	Am-Nar	Oscuro	Isoscutelar
		0,71	Am-Ver	Oscuro	

IV.II - Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IV.2.1.- Patrones

La tabla 4.19 recoge las propiedades y reproducibilidad de los patrones de flavonoides disponibles con las condiciones de análisis indicadas anteriormente. El tiempo muerto (t_0) es de 1,10 min a un flujo de 1ml/min y cada valor de tiempo de retención (t_R) es la media de 10 valores \pm Desviación Standard (DS).

TABLA 4.19

FLAVONOIDE	$t_R(\text{min}) (\pm\text{DS})$	k'	α
Isoscutelarefín-7-O- α -glucósido	1,897(± 0.085)	0,66	-
Luteolina	2,670(± 0.093)	1,34	2,03
Hypolaetina-8-O- β -D-glucósido	3,788(± 0.037)	2,39	1,78
Crisoeriol	8,029(± 0.618)	6,92	2,89
Apigenina	9,143(± 0.335)	7,40	1,06
Sideritoflavona	11,349(± 0.430)	9,69	1,30
Xantomicol	12,648(± 0.380)	10,06	1,03
Gardenina D	13,139(± 0.276)	11,12	1,10
8-metoxicirsilineol	13,391(± 0.154)	11,16	1,003
Desmetilnobiletina	14,591(± 0.045)	12,16	1,09

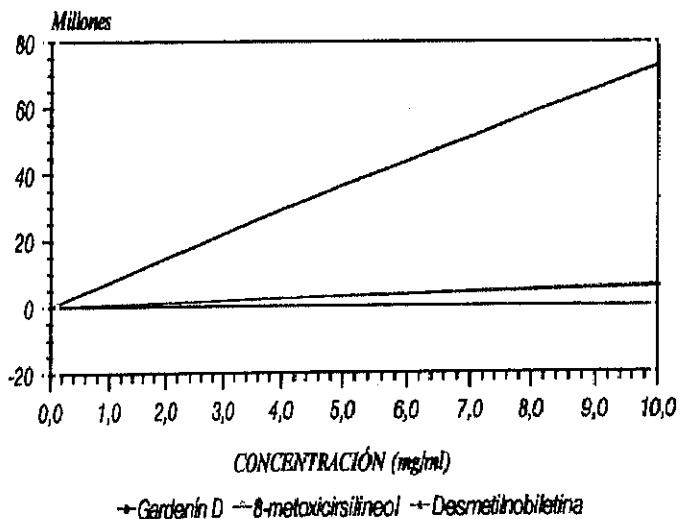
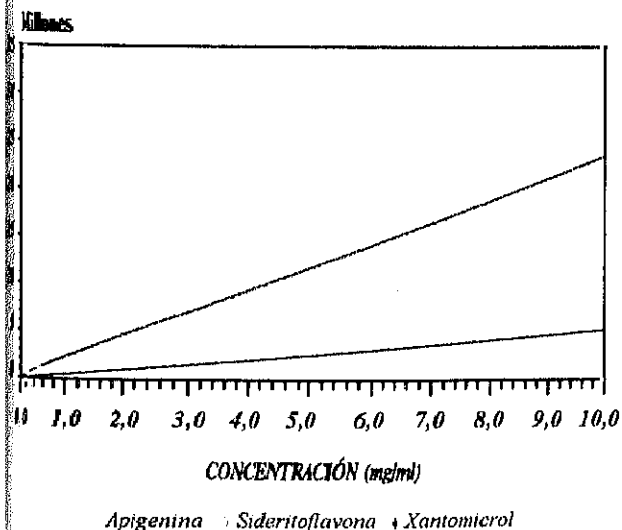
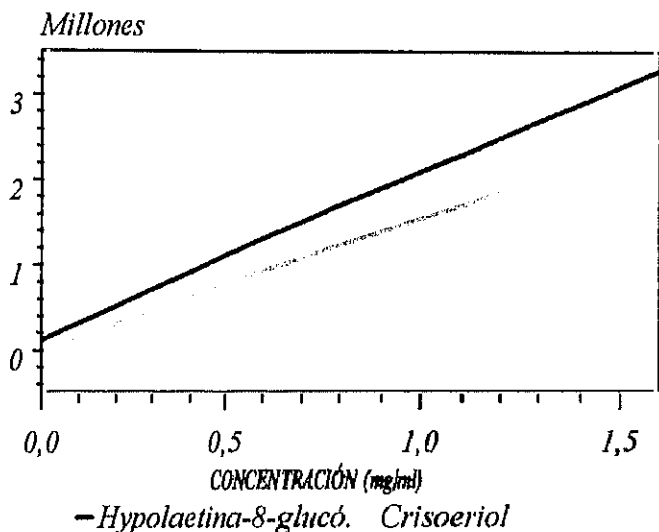
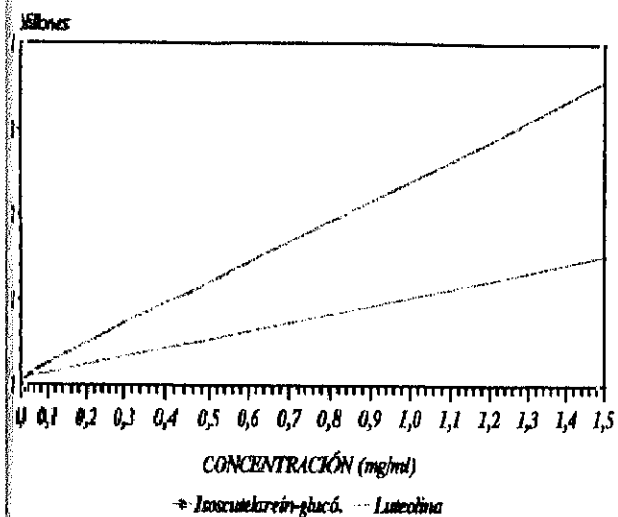
La tabla 4.20 muestra las distintas concentraciones de patrones empleadas para realizar la curva de calibración, así como las áreas obtenidas de cada una de ellas.

TABLA 4.20

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ÁREA
Isoscutelareín-7-glucósido	0,010	30752
	0,020	88718
	0,040	108677
Luteolina	0,027	19190
	0,055	26442
	0,073	63173
	0,550	76663
	1,100	148348
Hypolaetina-8-glucósido	0,0001	30520
	0,010	212454
	0,385	864383
Crisoeriol	0,060	84044
	0,080	148962
	0,120	155912
	0,240	376238
Apigenina	0,225	1033926
	0,450	1733129
	0,900	3195611
Sideritoflavona	0,0006	785
	0,001	5021
	0,003	17569
Xantomicrol	0,004	13861
	0,009	22836
	0,022	55355
Gardenín D	0,006	37916
	0,013	55524
	0,032	233711
8-metoxicirsilineol	0,005	10546
	0,020	11696
	0,040	12104
	0,100	60778
Desmetilnobiletina	0,695	344747
	1,390	641917
	3,475	2078032

Con estos datos se ha realizado la curva de calibrado de cada uno de los compuestos patrón.

CURVAS DE CALIBRADO DE PATRONES



IV.2.2.- Extractos de *Sideritis*

Las figuras 1 a 19 recogen los cromatogramas obtenidos para distintos extractos de varias especies analizadas con las condiciones de análisis citadas en el apartado correspondiente.

En las tablas 4.21 a 4.25 se muestran los flavonoides presentes en los distintos extractos de las dieciséis especies analizadas, así como su contenido, expresado en unidades de área.

12

¹FLAVONOIDES:

- 1.- Isoscutelareín-7-O-[alosil (1→2) glucósido]
- 2.- Luteolina
- 3.- Hypolaetina-8-O-β-D-glucósido
- 4.- Crisoeriol
- 5.- Apigenina
- 6.- Sideritoflavona
- 7.- Xantomicrol
- 8.- Gardenina D
- 9.- 8-metoxi-cirsilineol
- 10.- Desmetilnobiletina

²ESPECIES:

- 1.- *Sideritis foetens*
- 2.- *Sideritis luteola*
- 3.- *Sideritis almeriensis*
- 4.- *Sideritis hirsuta*
- 5.- *Sideritis leucantha* var *serratifolia*
- 6.- *Sideritis biflora*
- 7.- *Sideritis leucantha* ssp *incana* var *meridionalis*
- 8.- *Sideritis bourgeana*
- 9.- *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis*
- 10.- *Sideritis ibanyezii*
- 11.- *Sideritis pusilla* ssp *pusilla* var *granatensis*
- 12.- *Sideritis leucantha* var *incana*
- 13.- *Sideritis cillensis*
- 14.- *Sideritis pusilla*
- 15.- *Sideritis glauca*
- 16.- *Sideritis incana* ssp *incana*

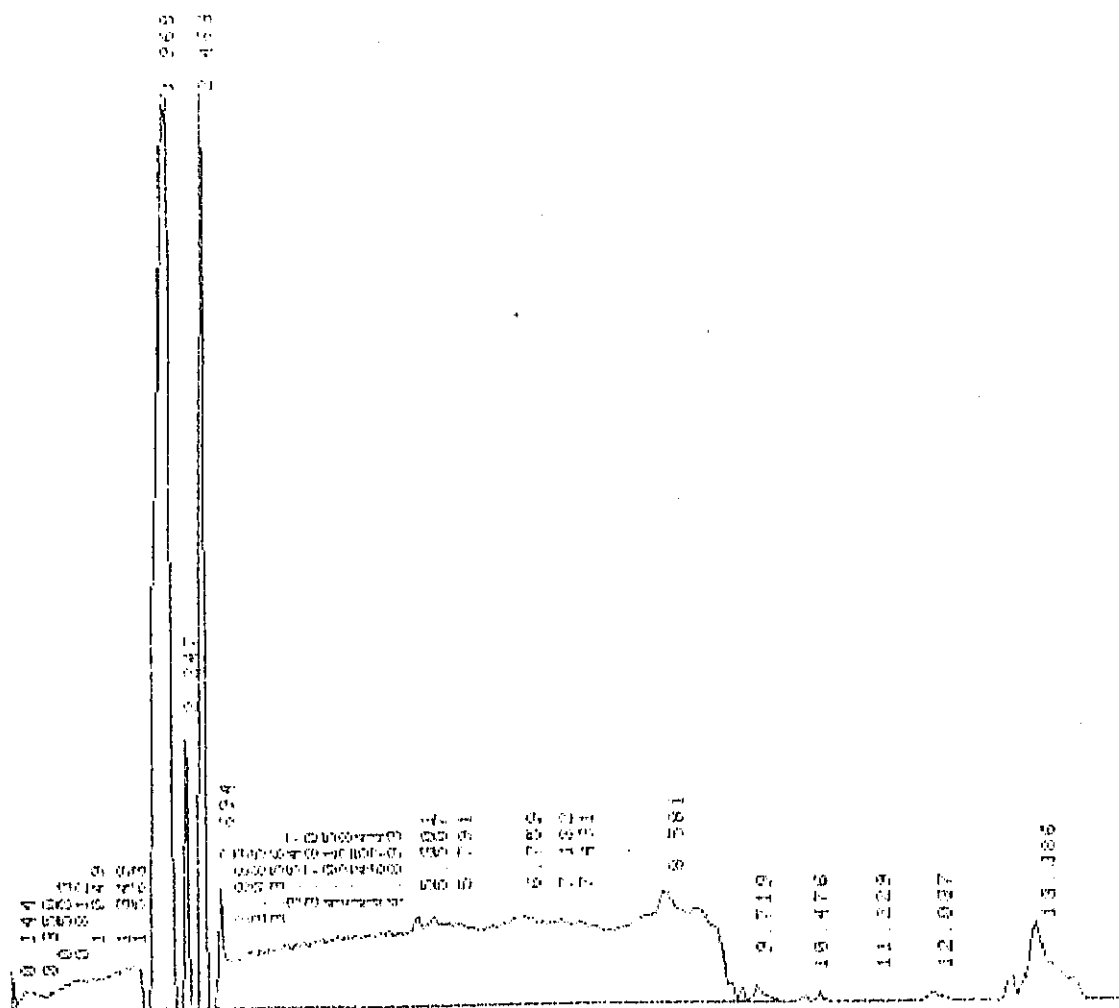


Figura 1 *Sideritis almeriensis* Exto hexánico

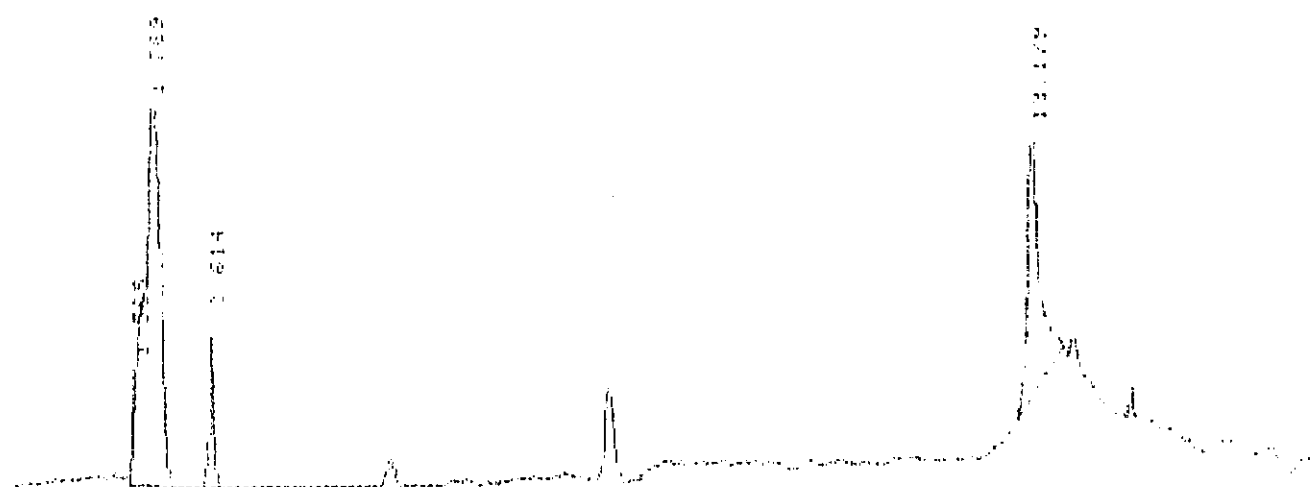


Figura 2 *Sideritis biflora* Exto hexánico

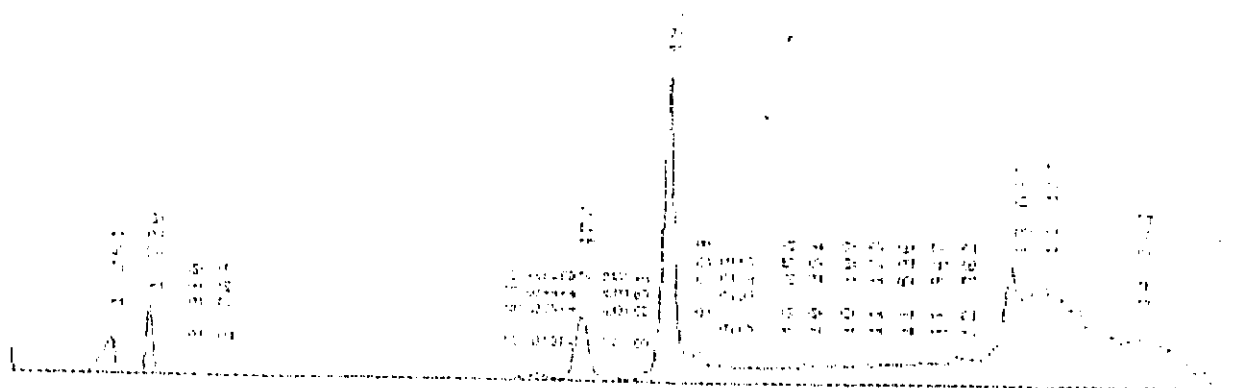


Figura 3 *Sideritis leucantha* var *serratifolia* Exto hexánico

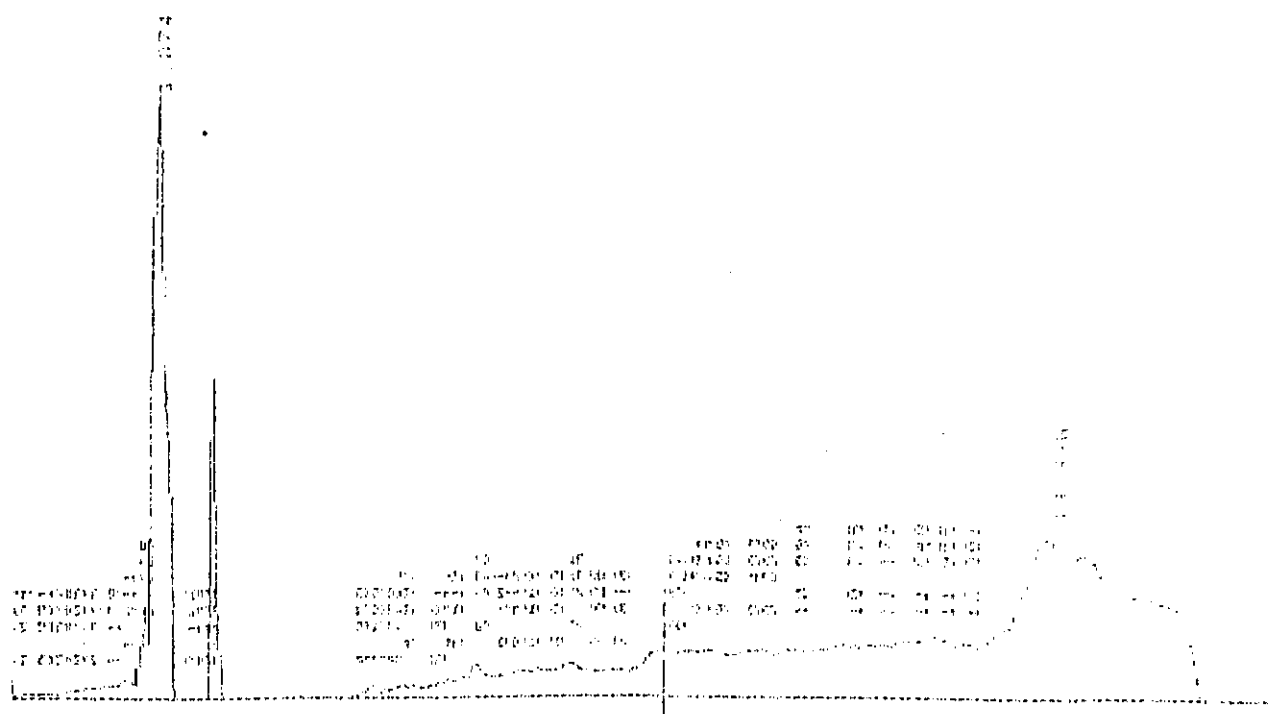


Figura 4 *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis* Exto hexánico

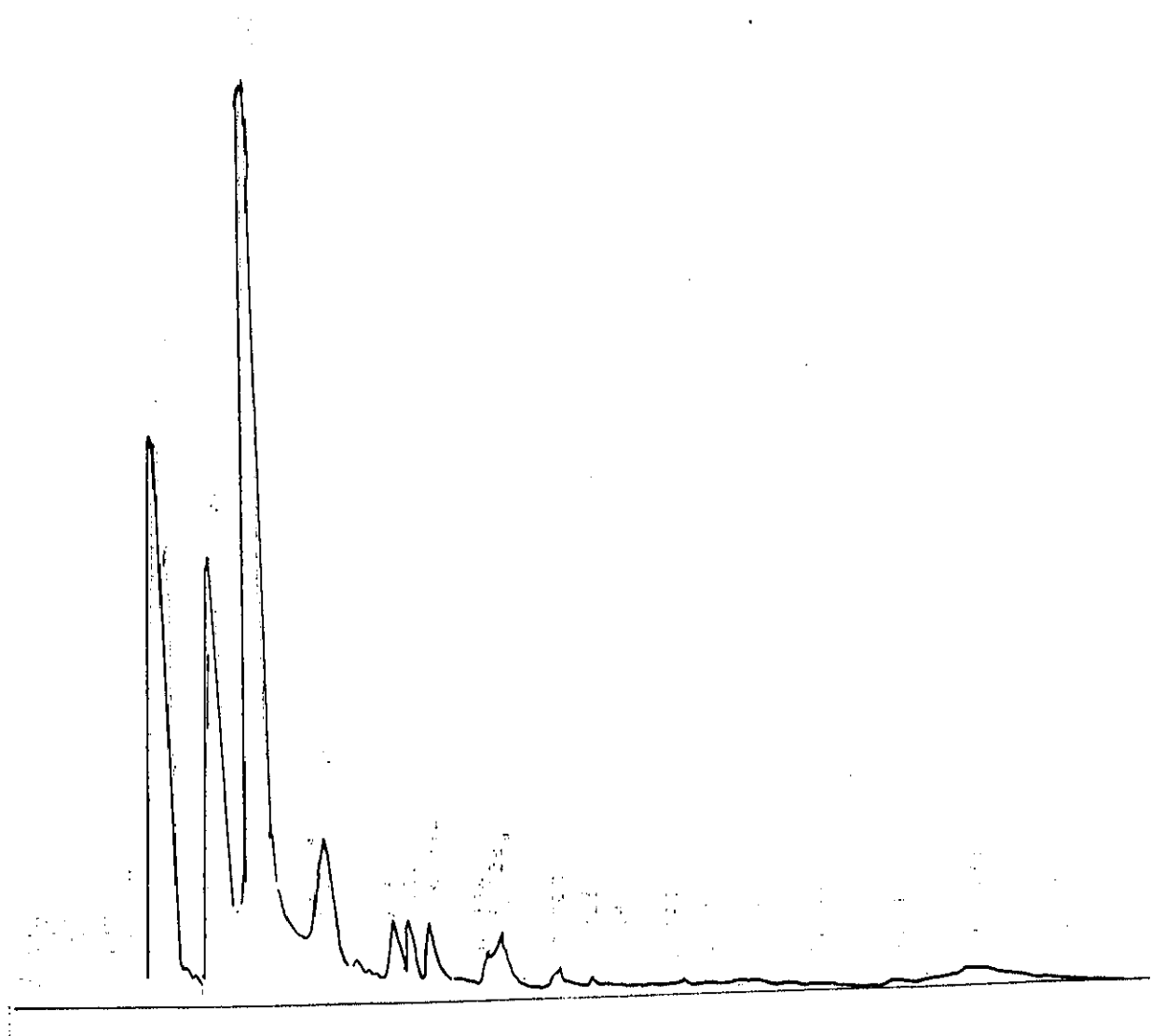


Figura 5 *Sideritis luteola* Exto etéreo

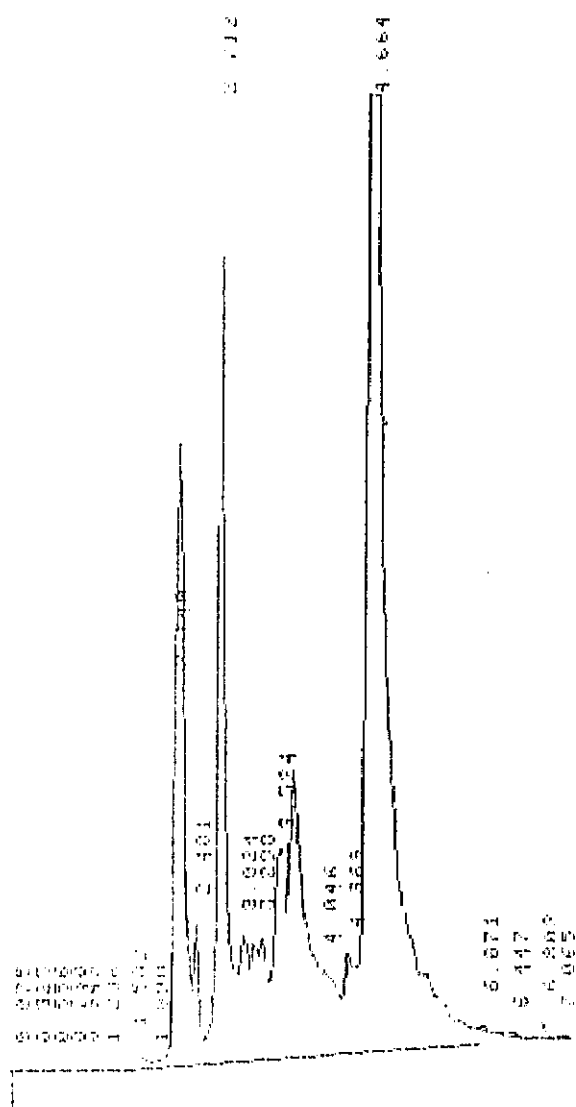


Figura 7 *Sideritis luteola* Exto acetato de etilo

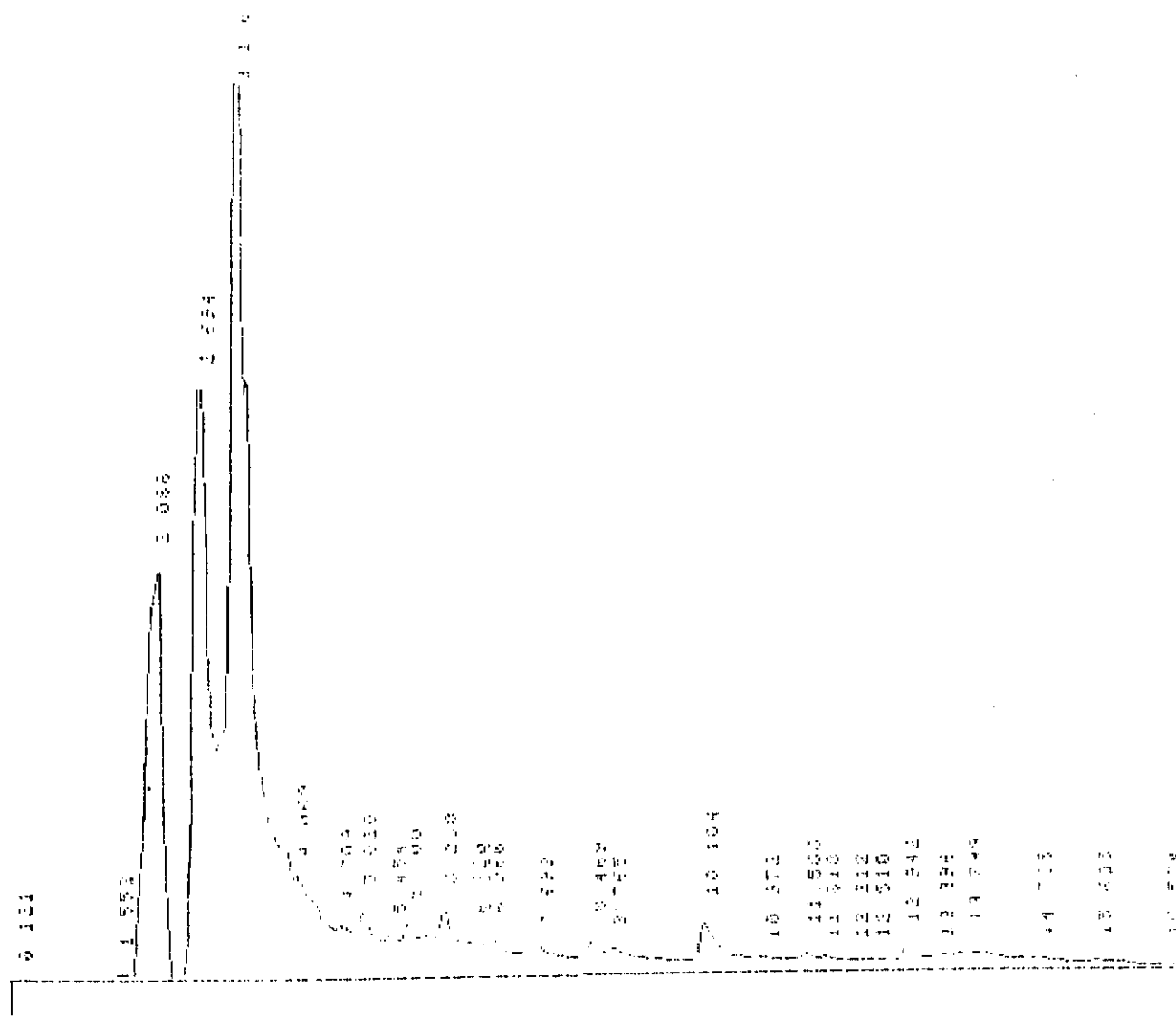


Figura 9 *Sideritis leucantha* ssp *incana* var *meridionalis* Exto acetato de etilo

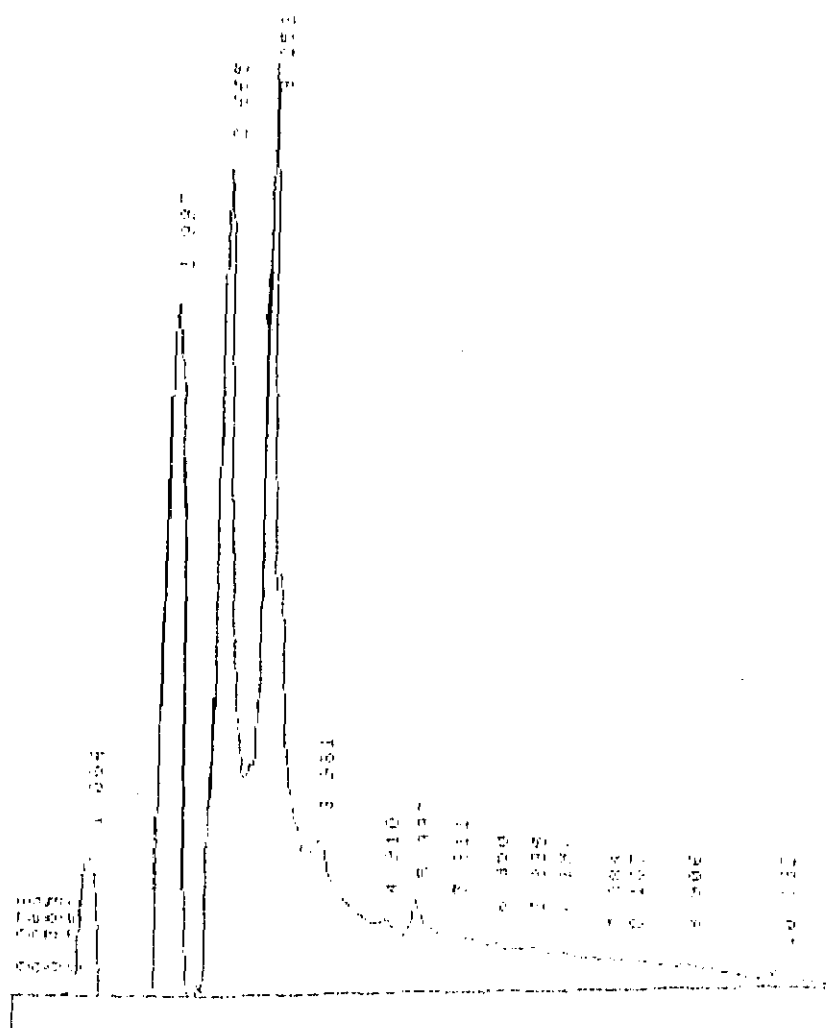


Figura 10 *Sideritis pusilla* ssp *pusilla* var *granatensis* Exto acetato de etilo

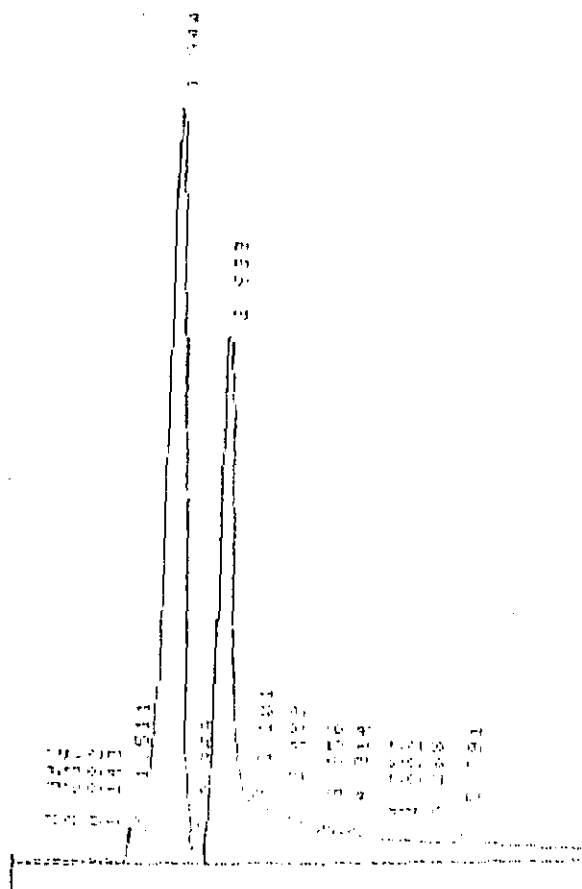


Figura 11 *Sideritis foetens* Exto butanólico

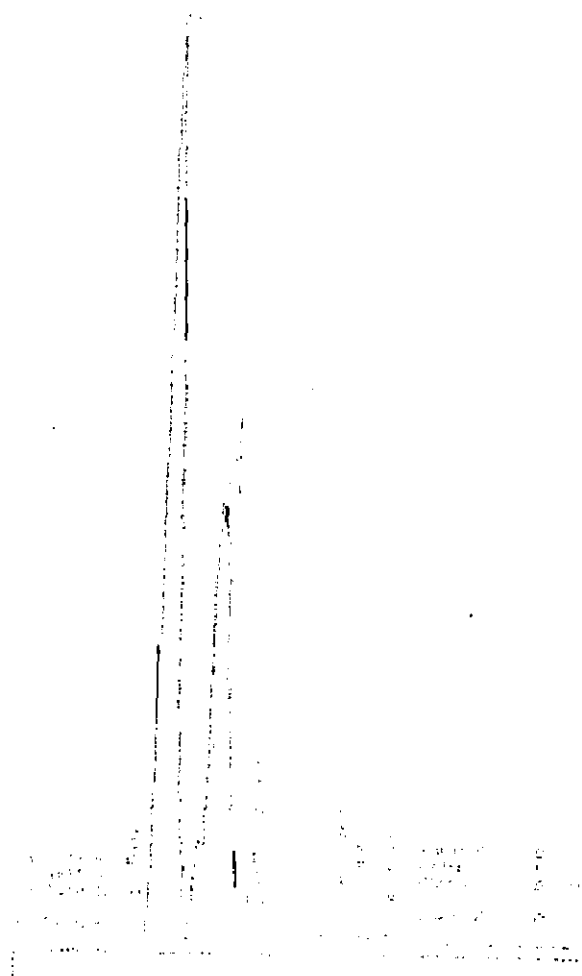


Figura 12 *Sideritis luteola* Exto butanólico

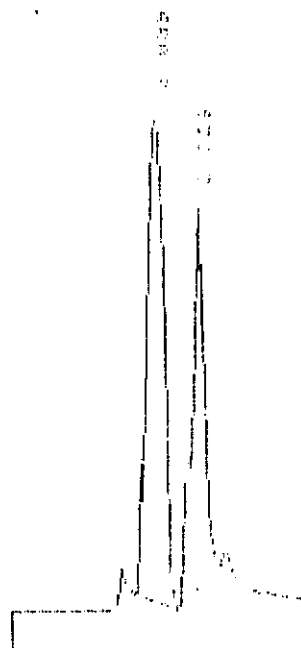
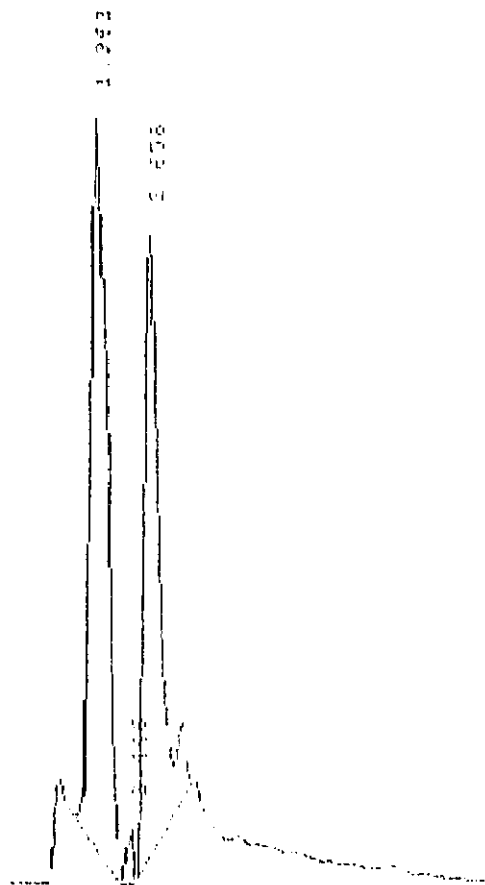


Figura 14 *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis* Exto butanólico

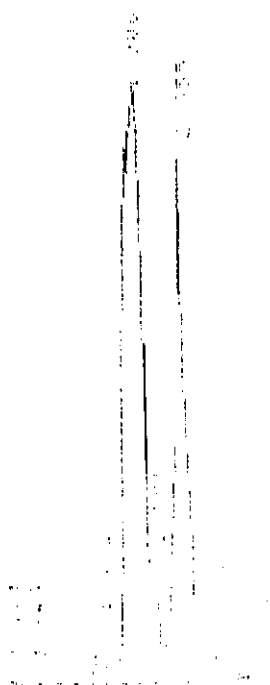


Figura 15 *Sideritis luteola* Exto acuoso

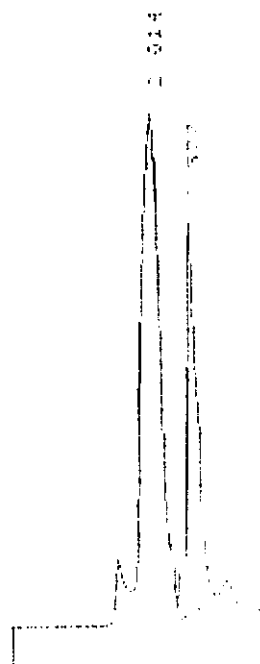
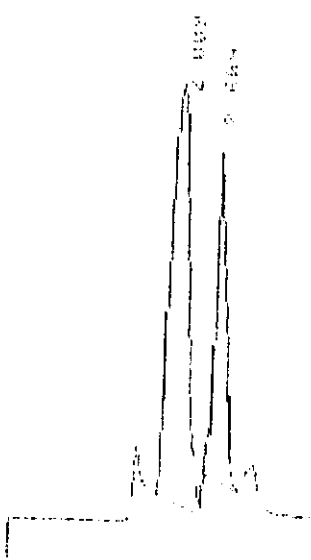


Figura 16 *Sideritis almeriensis* Exto acuoso



Sideritis hirsuta Exto acuoso

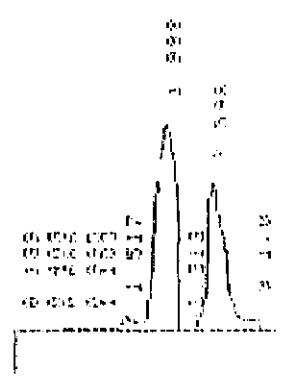


Figura 18 *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis* Exto acuoso

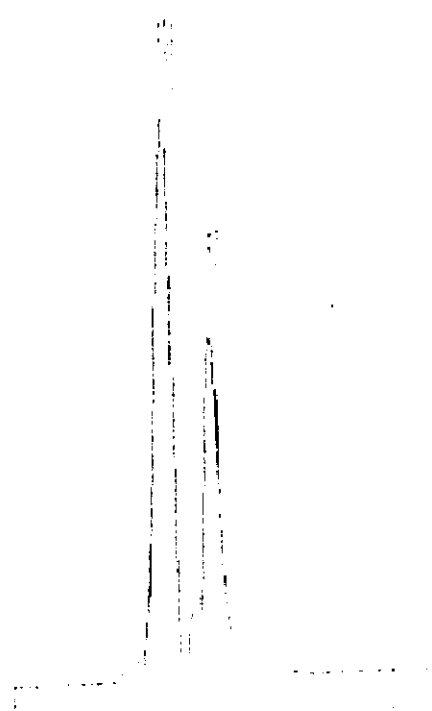


Figura 19 *Sideritis pusilla* ssp *pusilla* var *granatensis* Exto acuoso

FLAVONOIDE (Area)

ESPECIE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	84841	8694								
2	25143	32486		3534				1953		
3	55421	37503		58950				825250		
4	13617	28777						35867		
5	3142			3247				18019	43543	18516
6	35838	4329							13179	
7	24623	38875		3781				70165	28219	32068
8	460									672
9	54114	117		5200					138876	
10	2148	82216		55632				120656		22140
11	43372	73028		31913	13848	3549	3040	2378		7735
12	111037	125993	14159	25877	5411	655	13357	11267		
13	61874	65667		51005	16198	130347	84808	26991		
14	1996	26409								
15	17587	109272								
16	25848	79250		7248				34477		

FLAVONOIDE (Area)

ESP.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	28738	202548	19754						105838	
2	417572	480480	53275						111838	28844
3		124058	97533							53621
4			211880	695	4001					
5	2017888	215587	264625	421356	379505		244730			
6	187218	310516	60437	886764			1026796			
7	158243	281872	370001	486687	369050	113641				68523
8		332826	194687	235787		181301	103976	935975		
9	152414		30870							270392
10		210942	173427	62772	52971					307057
11	120959	35679	39499	56730	39687	20911	28993	44136	17726	
12		1852		35243	12274	855	4506	153488	80070	246200
13	122162	37297								
14	122195	67692	14655	271805		29166		69546	30720	
15	171152	296301	39856	68357		70337	19090	76018		35637
16	308223	311046	32454	131803	26668	29079		52255	867	857

TABLA 4.23 Flavonoides presentes en los extractos acetato de etilo

FLAVONOIDE (Area)

ESP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	356913	728675	72226					16109		2035
2	82388	118946	119226							138438
3	316925	238496	112827	96537	152861	43030	22228	100422		24720
4	187285	239869		96418		177269	105292	246480		
5	412586	719702	171689	153754	57387	5862	5052	2237		
6		11005		41577		9859	2559	2953	2387	
7	7068		551111	50913	12777	12336	4677	22603		30949
8	523748	1172001	210609	121334		36117		83483		
9	604051	782343		73351	71566					
10	666717	792642		122482		42061	18550	143198		226801
11	193276	1353152	249079							
12	369863	659982	76431	13912						
13	289997	494938	145905	139009	34510	40761	12879	13884		
14	108390	689484	151588	98746	88604	515		59275		
15	59546	206654	43209	7085						
16	518610	694817	51674	32086		12732				

TABLA 4.24 Flavonoides presentes en los extractos butanólicos

FLAVONOIDE (Area)

ESPECIE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	749091	440344	41906							
2	618800	271116								
3	423691	568391								
4	822816	1046337								
5	333437	477574	66839							
6	752083	894969		12331						
7	339212	836775								
8	293542	501614								
9	480701	302135								
10	705896	790418								
11	529888	692409								
12	535170	1447938								
13	1166278	850784	37751							
14	817203	1046373								
15	560609	846805								
16	1276221	1742651								

TABLA 4.25 Flavonoides presentes en los extractos acuosos

FLAVONOIDE (Area)

ESPECIE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	567354	296796								
2	335940	301965								
3	418669	247545								
4	403027	184453								
5	553057	290145								
6	127550	304247								
7	148835	146283								
8	345714	252021								
9	123245	146349								
10	415710	190781								
11	480939	235552								
12	522376	352117								
13	953278	221357								
14	209652	114221								
15	230131	176233								
16	520783	258248								

Partiendo de las áreas obtenidas para cada compuesto, realizamos la extrapolación de estos datos de la curva de calibrado de patrones, obteniendo así las concentraciones (en mg/ml) de cada uno de los flavonoides en los diferentes extractos analizados. Estos valores se recogen en las tablas 4.26 a 4.35

TABLA 4.26

FLAVONOIDE: Isoscutelareín-7-O-alosil- β -D-glucósido

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1	0,027	0,003	0,141	0,307	0,238
2	0,002	0,167	0,026	0,170	0,133
3	0,014	-	0,125	0,252	0,167
4	tr	-	0,070	0,338	0,161
5	tr	0,843	0,165	0,131	0,224
6	0,006	0,070	-	0,308	0,045
7	0,001	0,058	tr	0,134	0,054
8	tr	-	0,212	0,115	0,137
9	0,014	0,055	0,246	0,194	0,043
10	tr	-	0,272	0,289	0,166
11	0,009	0,042	0,072	0,215	0,194
12	0,038	-	0,147	0,217	0,211
13	0,017	0,042	0,113	0,483	0,393
14	tr	0,042	0,037	0,336	0,079
15	tr	0,063	0,016	0,227	0,088
16	0,002	0,121	0,210	0,529	0,211

TABLA 4.27

FLAVONOIDE: Luteolina

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1	tr	0,164	0,698	0,405	0,259
2	tr	0,446	0,079	0,233	0,265
3	tr	0,084	0,200	0,535	0,209
4	tr	0,030	0,202	1,021	0,145
5	-	0,177	0,689	0,443	0,253
6	tr	0,273	tr	0,867	0,267
7	tr	0,244	-	0,808	0,106
8	-	0,296	1,148	0,467	0,214
9	tr	-	0,753	0,265	0,107
10	0,041	0,172	0,763	0,761	0,152
11	0,032	tr	1,332	0,661	0,197
12	0,086	tr	0,628	1,429	0,316
13	0,025	tr	0,461	0,822	0,183
14	tr	0,027	0,658	1,021	0,074
15	0,069	0,259	0,168	0,818	0,137
16	0,038	0,274	0,664	1,720	0,220

TABLA 4.28

FLAVONOIDE: Hypolaetina-8-O-glucósido

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1	-	tr	tr	tr	-
2	-	tr	tr	-	tr
3	-	tr	tr	-	-
4	-	0,039	-	-	-
5	-	0,066	0,019	tr	-
6	-	tr	-	-	-
7	-	0,119	0,211	-	-
8	-	0,031	0,038	-	-
9	-	tr	-	-	-
10	-	0,020	-	-	-
11	tr	tr	0,058	-	-
12	tr	-	tr	-	-
13	tr	-	0,006	tr	-
14	-	tr	0,009	-	-
15	-	tr	tr	-	-
16	-	tr	tr	-	-

TABLA 4.29

FLAVONOIDE: Crisoeriol

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1		-	-	-	-
2	0,004	-	-	-	-
3	0,040	-	0,64	-	-
4	tr	0,002	0,064	-	-
5	0,004	0,273	0,100	-	-
6		0,572	0,028	0,010	-
7	0,004	0,315	0,034	-	-
8	-	0,153	0,800	-	-
9	0,005	-	0,049	-	-
10	0,037	0,042	0,080	-	-
11	0,022	0,038	-	-	-
12	0,018	0,024	0,011	-	-
13	0,034	-	0,091	-	-
14		0,176	0,065	-	-
15		0,046	0,006	-	-
16	0,006	0,086	0,022	-	-

TABLA 4.30

FLAVONOIDE: Apigenina

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	tr	-	-
4	-	tr	-	-	-
5	-	0,024	tr	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	0,020	tr	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	tr	-	-
10	-	tr	-	-	-
11	tr	tr	-	-	-
12	tr	tr	-	-	-
13	tr	-	tr	-	-
14	-	-	tr	-	-
15	-	-	-	-	-
16	0,015	tr	-	-	-

TABLA 4.31

FLAVONOIDE: Sideritoflavona

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	0,080	-	-
4	-	-	0,049	-	-
5	-	tr	0,006	-	-
6	-	-	0,014	-	-
7	-	0,219	0,019	-	-
8	-	0,353	0,066	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	0,078	-	-
11	0,002	0,036	-	-	-
12	tr	tr	-	-	-
13	0,055	-	0,075	-	-
14	-	0,052	tr	-	-
15	-	0,015	-	-	-
16	0,017	0,052	0,020	-	-

TABLA 4.32

FLAVONOIDE: Xantomicrol

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	0,008	-	-
4	-	-	0,042	-	-
5	-	0,097	0,002	-	-
6	-	0,410	0,0008	-	-
7	-	-	0,001	-	-
8	-	0,041	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	0,007	-	-
11	0,001	0,011	-	-	-
12	0,005	0,001	-	-	-
13	0,010	-	0,005	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	0,007	-	-	-
16	-	-	-	-	-

TABLA 4.33

FLAVONOIDE: Gardenina D

ECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
	-	-	0,004	-	-
	tr	-	-	-	-
	0,115	-	0,015	-	-
	0,006	-	0,035	-	-
	0,004	-	0,002	-	-
	-	-	0,002	-	-
	0,011	-	0,005	-	-
	-	0,130	0,013	-	-
	-	-	-	-	-
	0,018	-	0,021	-	-
	0,002	0,008	-	-	-
	0,003	0,022	-	-	-
	-	-	0,003	-	-
	-	0,011	0,010	-	-
	-	0,012	-	-	-
	0,006	0,009	-	-	-

TABLA 4.34

FLAVONOIDE: 8-metoxicirsilineol

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1	-	0,187	-	-	-
2	-	0,198	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	0,076	-	-	-	-
6	0,022	-	0,003	-	-
7	0,049	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	0,246	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	0,030	-	-	-
12	-	0,141	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	0,053	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	tr	-	-	-

TABLA 4.35

FLAVONOIDE: Desmetilnobiletina

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1	-	-	0,074	-	-
2	-	0,086	0,135	-	-
3	tr	0,085	0,084	-	-
4	-	-	-	-	-
5	0,081	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	0,087	0,095	0,087	-	-
8	0,073	-	-	-	-
9	-	0,195	-	-	-
10	0,083	0,211	0,175	-	-
11	0,076	-	-	-	-
12	-	0,184	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	0,089	-	-	-
16	0,257	0,007	-	-	-

Por lo tanto, el contenido total en cada uno de los flavonoides es el siguiente:

TABLA 4.36 CONCENTRACIÓN (mg/ml)

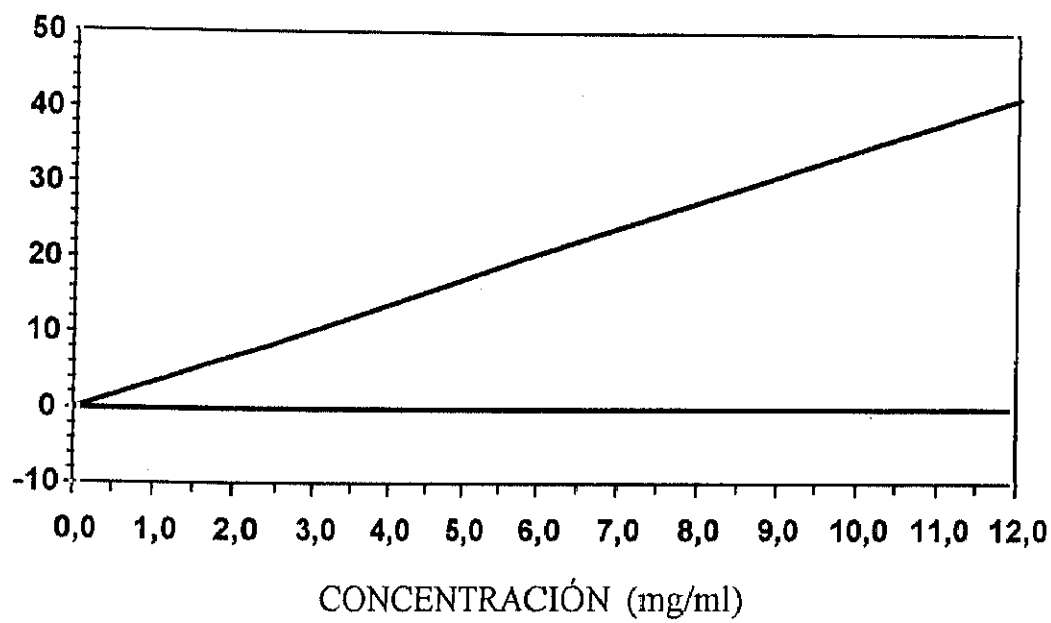
ESPECIE	Isosc	Luteo	Hypol	Criso	Apig	Sider	Xant	Gar-D	8MeO-cirsil	Desmetil-nobilet
1	0,708	2,082	tr	tr	-	-	-	0,004	0,187	0,256
2	0,498	1,709	tr	0,040	-	-	-	-	0,198	0,800
3	0,558	1,406	tr	0,068	tr	0,080	0,008	0,120	-	0,292
4	0,569	1,632	0,039	0,066	tr	0,049	0,042	0,041	-	-
5	1,363	3,933	0,085	0,373	0,024	0,006	0,099	0,006	0,076	0,282
6	0,429	1,270	-	0,610	-	0,014	0,411	0,002	0,025	-
7	0,247	0,746	0,330	0,353	0,020	0,238	0,001	0,016	0,049	0,604
8	0,464	1,359	0,069	0,383	-	0,419	0,041	0,143	-	0,254
9	0,522	1,631	-	0,054	tr	-	-	-	0,246	0,676
10	0,727	2,117	0,020	0,159	tr	0,078	0,007	0,039	-	1,622
11	0,568	1,575	0,058	0,060	tr	0,038	0,012	0,010	0,030	0,265
12	0,613	1,792	tr	0,053	tr	tr	0,006	0,025	0,141	0,639
13	1,048	3,050	0,006	0,091	tr	0,130	0,057	0,016	-	-
14	0,494	1,519	0,009	0,241	tr	0,052	-	0,212	0,053	-
15	0,394	1,177	tr	0,052	-	0,015	0,007	0,012	-	0,309
16	1,073	2,130	tr	0,130	tr	0,089	-	0,024	tr	0,254

A partir de estas concentraciones se ha obtenido el porcentaje final de cada uno de los flavonoides en planta seca (TABLA 4.37):

ESPECIE	Isosc	Luteo	Hypol	Criso	Apig	Sider	Xant	Gar-D	8-MeO-cirsil	Desmet-nobilet
1	1,00	1,37	tr	tr	-	-	-	0,005	0,002	0,002
2	0,66	1,02	tr	0,05	-	-	-	-	0,26	1,06
3	0,005	1,02	tr	0,08	tr	0,08	0,01	0,15	-	0,36
4	0,39	0,94	0,02	0,04	tr	0,03	0,03	0,03	-	-
5	2,83	1,49	0,16	0,72	0,04	0,01	0,02	0,01	0,14	0,55
6	2,05	1,40	-	2,86	-	0,06	1,90	0,01	0,10	-
7	0,37	1,15	0,46	0,46	0,03	0,37	0,001	0,02	0,07	0,93
8	0,92	2,12	0,14	1,80	-	0,80	0,08	0,28	-	0,40
9	0,81	1,12	-	0,07	tr	-	-	-	0,36	0,99
10	1,38	1,90	0,04	0,30	tr	0,15	0,001	0,07	-	2,08
11	1,12	2,22	0,11	0,11	tr	0,80	0,02	0,02	0,05	0,50
12	1,69	2,40	tr	0,10	tr	tr	0,01	0,06	0,39	1,70
13	2,08	2,10	0,01	0,30	tr	0,38	0,17	0,04	-	-
14	1,20	2,10	0,02	0,57	tr	0,12	-	0,05	0,12	-
15	0,37	1,29	tr	0,04	-	0,01	0,006	0,01	-	0,28
16	1,58	2,30	tr	0,18	tr	0,13	-	0,03	-	0,36

Al realizar el análisis por HPLC de los distintos extractos, se obtuvo un compuesto flavónico con un tiempo de retención de 2,780 minutos (F1) que no se correspondía con ninguno de los patrones; por lo tanto, decidimos aislarlo e identificarlo. En la tabla 4.38 se recogen las áreas correspondientes al mismo en cada uno de los extractos, y en la tabla 4.39, la concentración en mg/ml a que corresponden por extrapolación de la curva de calibrado de F1

CURVA DE CALIBRADO DE F1



—Flavonoide 1

TABLA 4.38

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanólico	Exto acuoso
1	18389	202548	136418	63439	
2	2868	480480	30768	50263	20644
3	5900		119918		
4		18579	786431	50000	
5		94478	1215060	138011	25358
6	4328	251947	806597	82590	2098
7	3228	242449	81143	198455	
8		875231		83418	
9	11766				
10		95008		171672	
11	17954	287074	255308	416722	
12			243902	189855	
13	tr	240269	925805	209334	
14		187525	64372	255908	
15		12610	352265	864290	
16		772524	1212098	372942	

TABLA 4.39

CONCENTRACIÓN DE F1 (mg/ml)

ESPECIE	Exto hexánico	Exto etéreo	Exto acetato de etilo	Exto butanol	Exto acuo	Cont. total
1	0,014	0,068	0,049	0,027		0,158
2	0,010	0,148	0,018	0,024	0,015	0,215
3	0,011		0,044			0,055
4		0,014	0,237	0,024		0,275
5		0,036	0,362	0,049	0,016	0,463
6	0,010	0,082	0,243	0,033	0,010	0,378
7	0,010	0,079	0,033	0,067		0,189
8		0,263		0,033		0,296
9	0,013					0,013
10		0,037		0,059		0,096
11	0,014	0,092	0,083	0,130		0,319
12			0,080	0,064		0,144
13		0,079	0,278	0,070		0,427
14		0,063	0,028	0,083		0,174
15		0,013	0,111	0,260		0,384
16		0,233	0,361	0,117		0,711

Por lo tanto, el contenido total de F1 en cada especie, expresado en % en peso de planta seca, es el siguiente:

ESPECIE	F1 (%)
1	0,002
2	0,20
3	0,06
4	0,13
5	0,78
6	1,50
7	0,31
8	0,60
9	0,02
10	0,19
11	0,64
12	0,38
13	1,25
14	0,48
15	0,37
16	1,01

IV.4.- Elucidación estructural de F1

IV.4.1.- CCF

En primer lugar se realizó la hidrólisis ácida del compuesto en placa. seguidamente se procedió al desarrollo cromatográfico de la misma con las condiciones de fase móvil y fase estacionaria anteriormente citadas, y empleando como patrones los azúcares glucosa, xilosa, rhamnosa y arabinosa.

Se obtuvieron dos manchas a R_f 0,28 y 0,38, ambas de color oscuro, y que coinciden con los valores obtenidos para glucosa y xilosa.

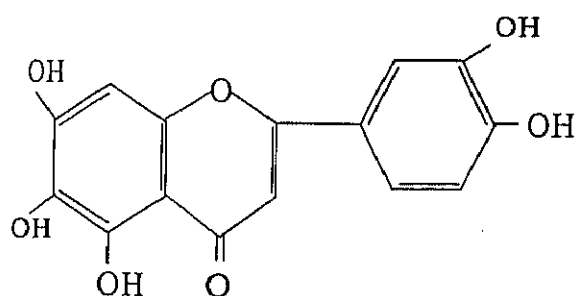
Por lo tanto, podemos sugerir que el compuesto F1 es un heterósido cuya parte azucarada está formada por glucosa y xilosa.

IV.4.2.- Espectro de absorción UV/VIS

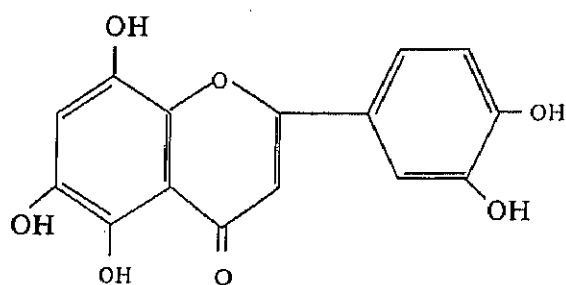
Llevamos a cabo el espectro de absorción UV/VIS del mismo compuesto, comparándose los máximos de absorción con los distintos reactivos a las siguientes λ :

REACTIVO	λ MÁXIMA
MeOH	203, 273, 302
NaOMe	212, 273, 368
NaOMe tras 5'	212, 280, 368
AlCl ₃	205, 279, 320, 347
AlCl ₃ +HCl	201, 275, 318
NaOAc	218, 266, 379
NaOAc tras 5'	219, 269, 379

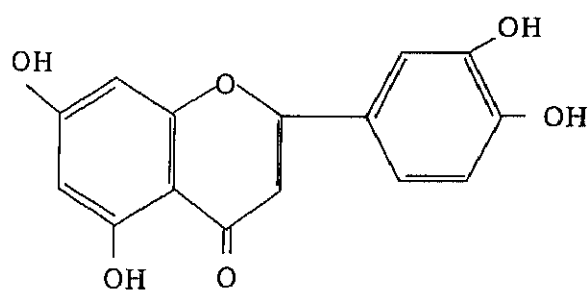
Tras la interpretación de los espectros obtenidos, encontramos cuatro posibles estructuras para la molécula, recogidas en la figura 20.



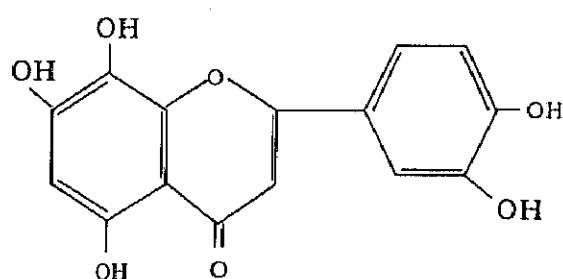
I.- 6-HIDRÓXILUTEOLINA



II.- 5,6,8,4',5',PENTAHIDROXIFLAVONA



III.- LUTEOLINA



IV.- 5,7,8,4',5' PENTAHIDROXIFLAVONA

Figura 20

La posición de unión más probable para el resto azucarado es el grupo hidroxilo en posición 7.

Tras la revisión bibliográfica realizada sobre flavonoides del Género *Sideritis*, no se encontró ninguna molécula con grupo hidroxilo en posición 5', por lo que consideramos más próximas a la estructura real las moléculas I y III que las demás.

IV.4.3.- Espectroscopía de RMN

Tras realizarse los espectros de RMN del compuesto F1 con las condiciones citadas en el apartado correspondiente, se obtuvieron los resultados recogidos en las tablas 4.40 y 4.41

TABLA 4.40

Datos espectroscópicos de ^{13}C -RMN (CD_3OD) del compuesto 1

AGLICONA	AZÚCARES
2 166,8	Xilosa
3 104,6	1 103,7
4 184,5	2 84,0
5 152,0	3 73,1
6 101,7	4 68,5*
7 154,1	5 65,0
8 129,7	Glucosa
9 148,1	1 102,9
10 107,7	2 72,6
1' 123,2	3 77,5
2' 129,8	4 70,7*
3' 117,0	5 78,5
4' 163,0	6 62,2
5' 117,0	
6' 129,8	

Los valores señalados con un asterisco (*) pueden ser intercambiados.

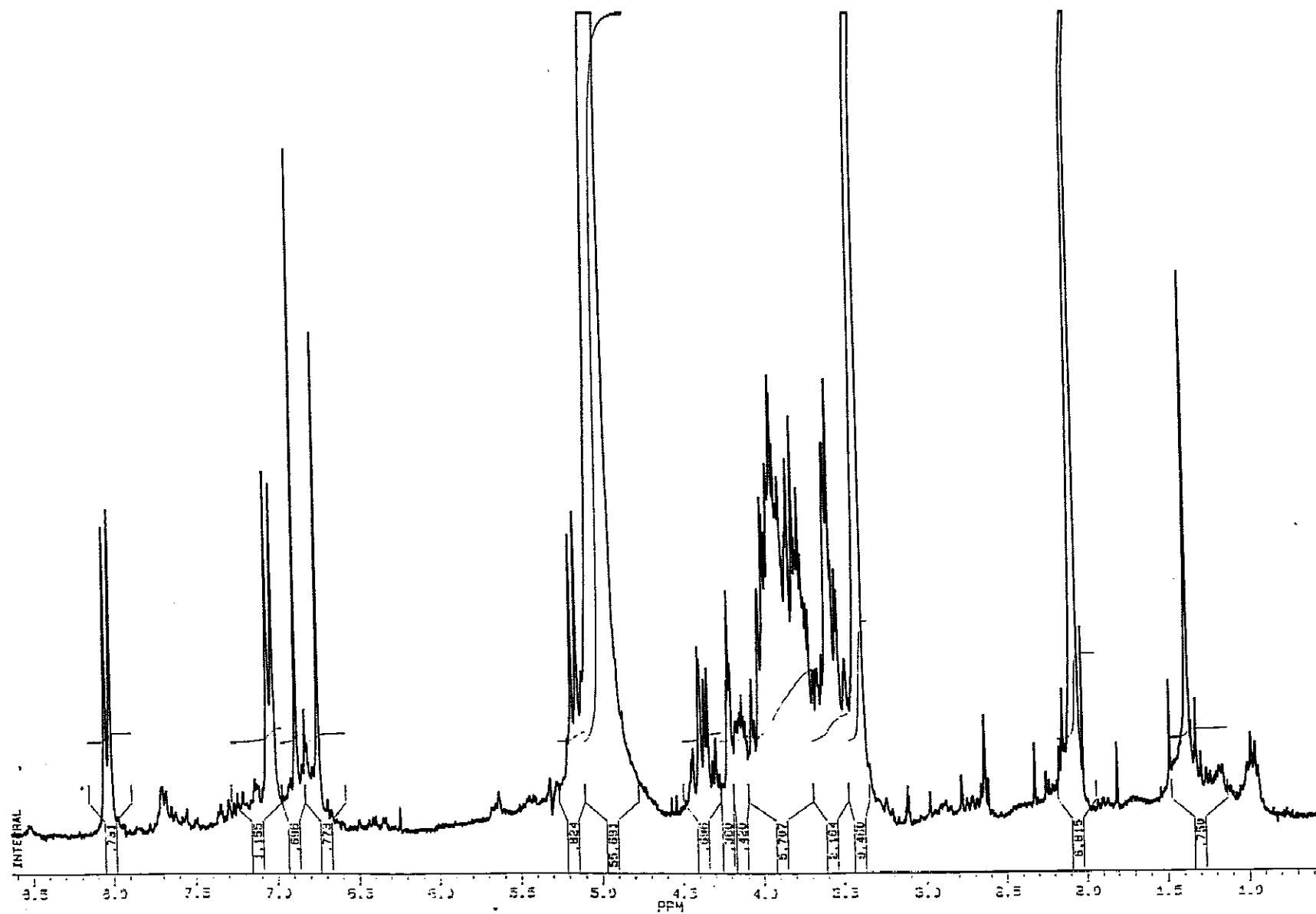
TABLA 4.41

Datos espectroscópicos de ^1H -RMN (CD_3OD) del compuesto 1^(a)

AZÚCARES			
Xil 1	5.03 d (6.9)	Glu 1	5.15 d (8)
Xil 2	3.83 m ^(b)	Glu 2	3.55 dd (8; 2.9)
Xil 3	3.75 m ^(b)	Glu 3	4.2 dd (2.9; 2.9)
Xil 4	3.58 dd (5.5; 2)	Glu 4	3.73 m ^(b)
Xil 5	3.85 m ^(b)	Glu 5	4.13 ddd (10;4.9;2)
	4.05 dd (12; 2)	Glu 6	4.35 dd (4.9; 12)
			4.40 dd (12; 2)
AGLICONA			
H 3	6,74 s		
H 6	6,88 s		
H 2',6'	8,02 d (8,3)		
H 3',5'	7,03 d (8,3)		

^(a) las señales fueron asignadas por estudios COSY ^1H - ^1H . Los valores de desplazamientos químicos se expresan en ppm a partir de TMS, y los valores de la constante de acoplamiento, J, en Herzios, se presentan entre paréntesis.

^(b) el acoplamiento no está claramente definido o se encuentra oscurecido por superposición.



HZGL6A3.100
DATE 23-9-93

SF 250.134
SY 250.0
Q1 5145.172
SI 32768
TD 32768
SW 3546.099
HZ/PT .216

PW 7.0
RD 0.0
AQ 4.620
RG 20
NS 128
TE 297

FW 4500
Q2 2714.499
DP 6SL P5

LS .300
GB 0.0
CX 35.00
CY 17.00
F1 6.632P
F2 5.43P
HZ/CM 57.776
PPM/CM .231
SR 3212.40

1: Espectro de ^1H -RMN de F1 Solvente: CD_3OD

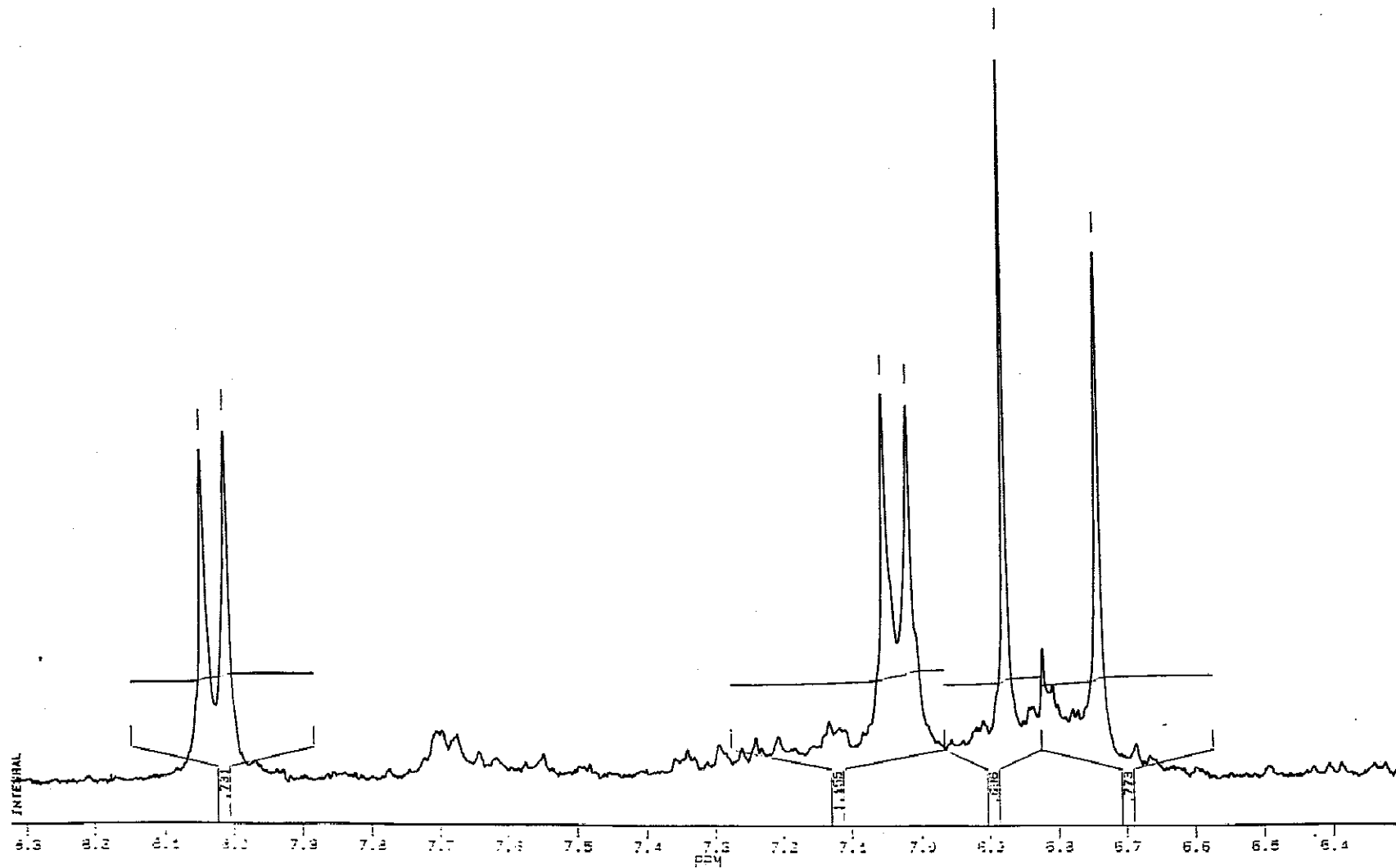
HERTZ

2011.62
2002.87

1783.53
1754.76

1719.78

1685.87



HZDLGA3.100
DATE 23-9-93

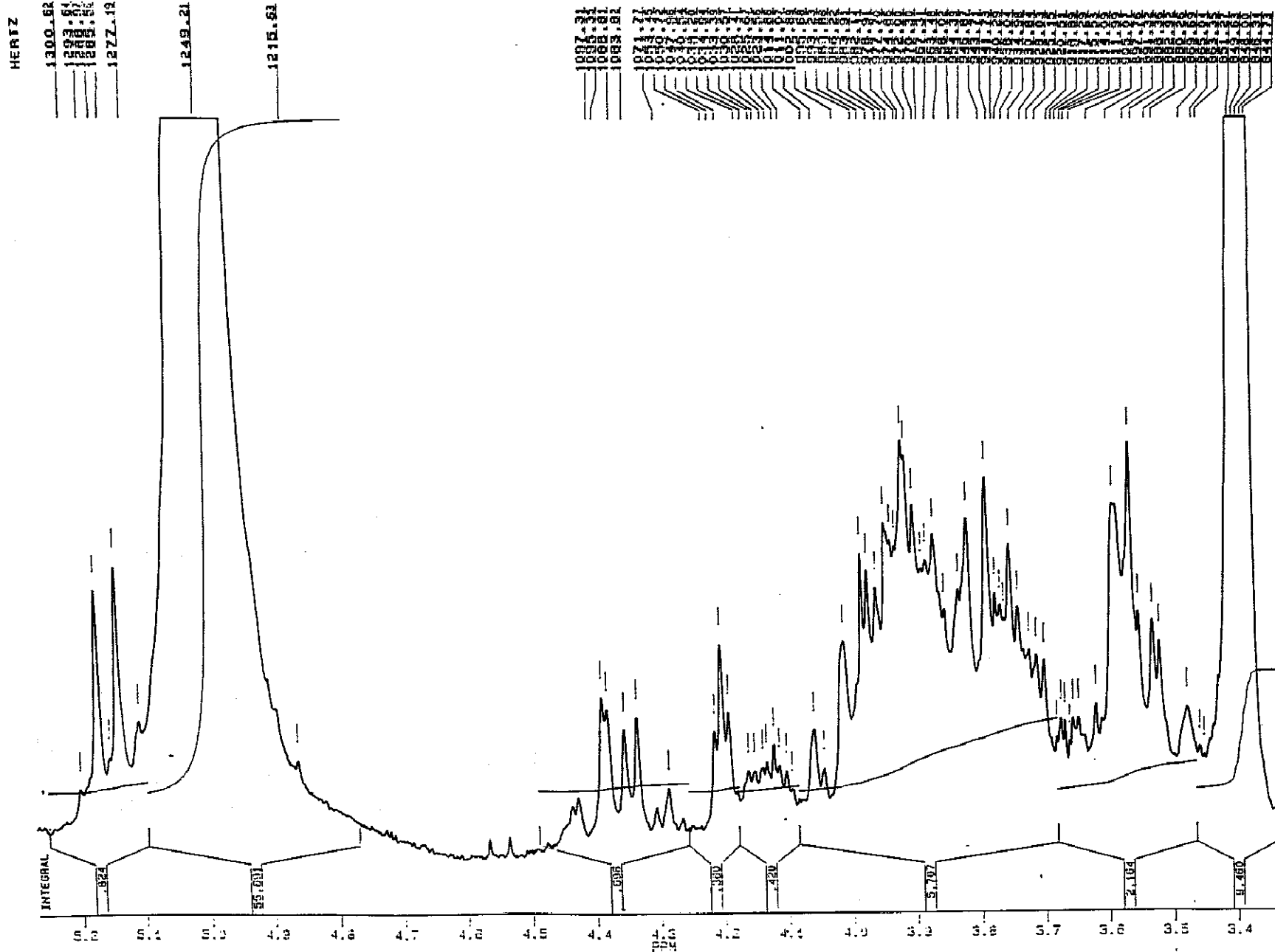
SF 250.134
SY 250.0
O1 5145.172
SI 32768
TD 32768
SW 3546.099
HZ/PT .216

PW 7.0
RD 0.0
AQ 4.620
RG 20
NS 128
TE 297

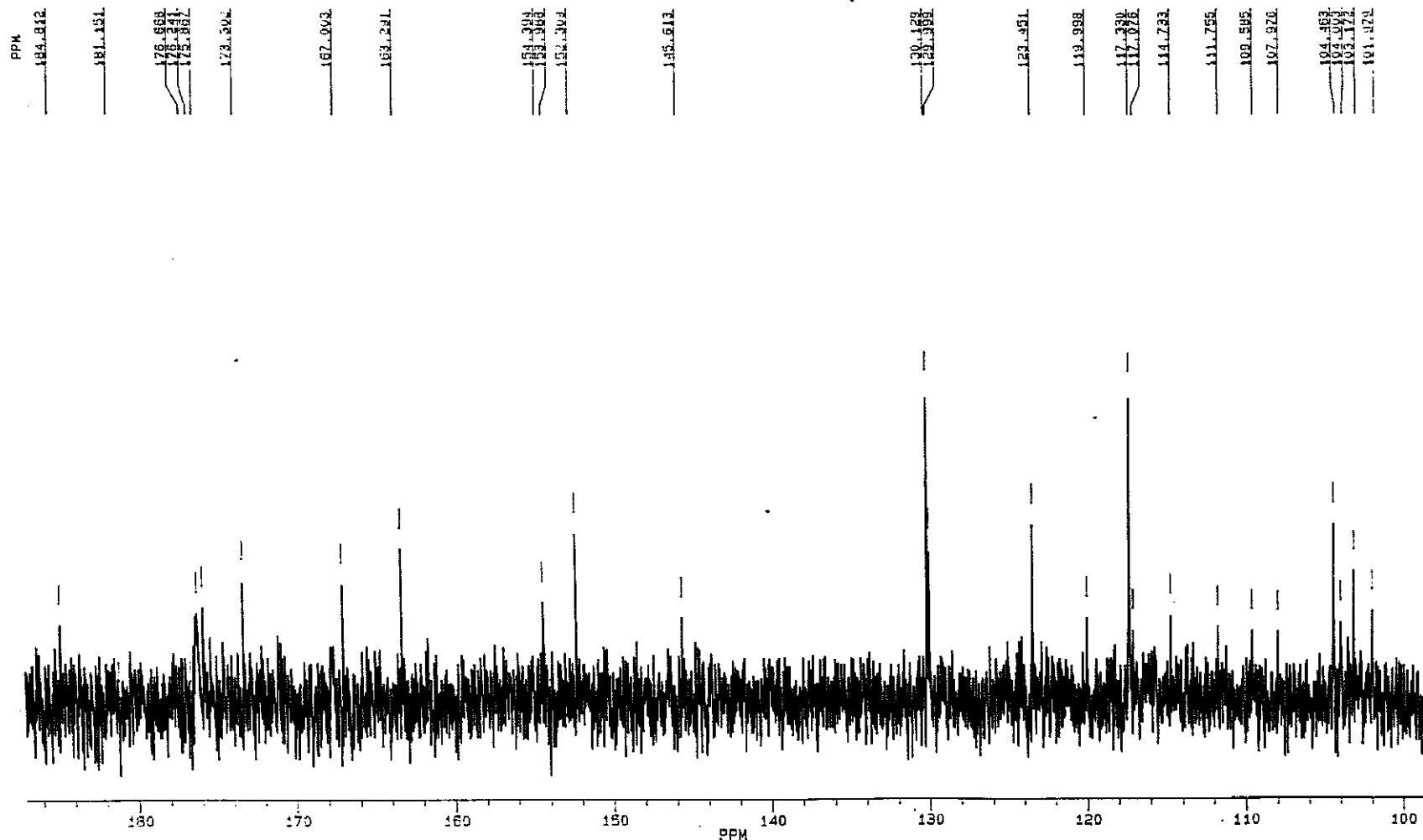
FW 4500
O2 2714.499
DP 6SL PG

LB .300
GB 0.0
CX 35.00
CY 17.00
F1 8.322P
F2 8.322P
HZ/CM 14.433P
PPM/CM .058
SR 3812.40

2: Ampliación del espectro inicial de ^1H -RMN de F1



3: Ampliación del espectro inicial ^1H -RMN de F1



AA100S.103
AU PROG:
X02.AU
DATE 13-12-93

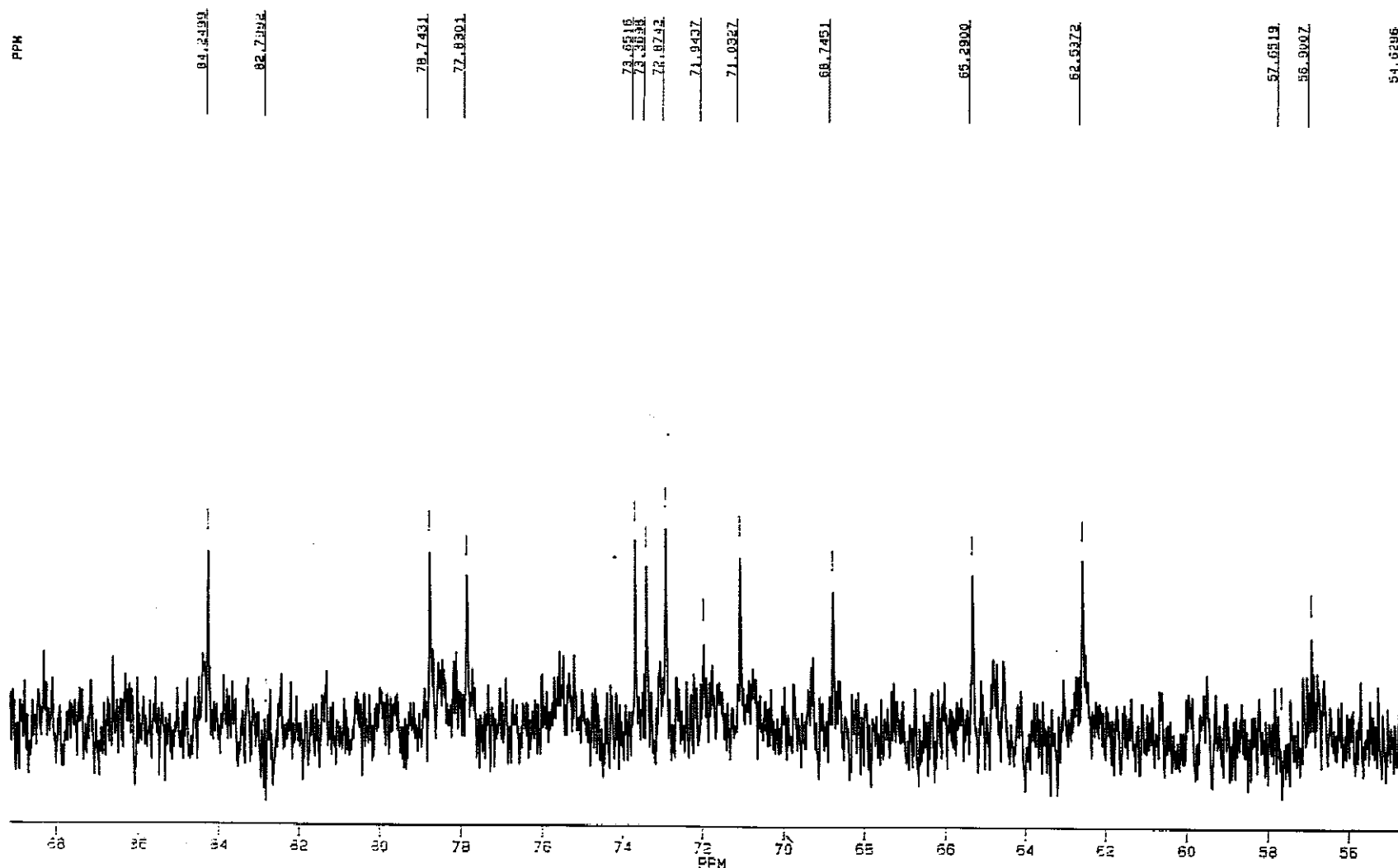
SF 62.896
SY 62.0
Q1 2560.705
SI 65536
TD 65536
SW 13513.514
HZ/PT .412

PW 0.0
RD 0.0
AQ 2.425
RG 400
NS 30000
TE 237

FW 16900
Q2 5206.105
DP 17H D0

LB 1.000
GB 0.0
CX 35.00
CY 10.00
F1 187.026P
F2 98.070P
HZ/CM 159.858
PPM/CM 2.542
SR -5904.02

4: Ampliación del espectro inicial de ^{13}C -RMN de F1



AA100S.103
AU PROG:
X02.AU
DATE 13-12-93

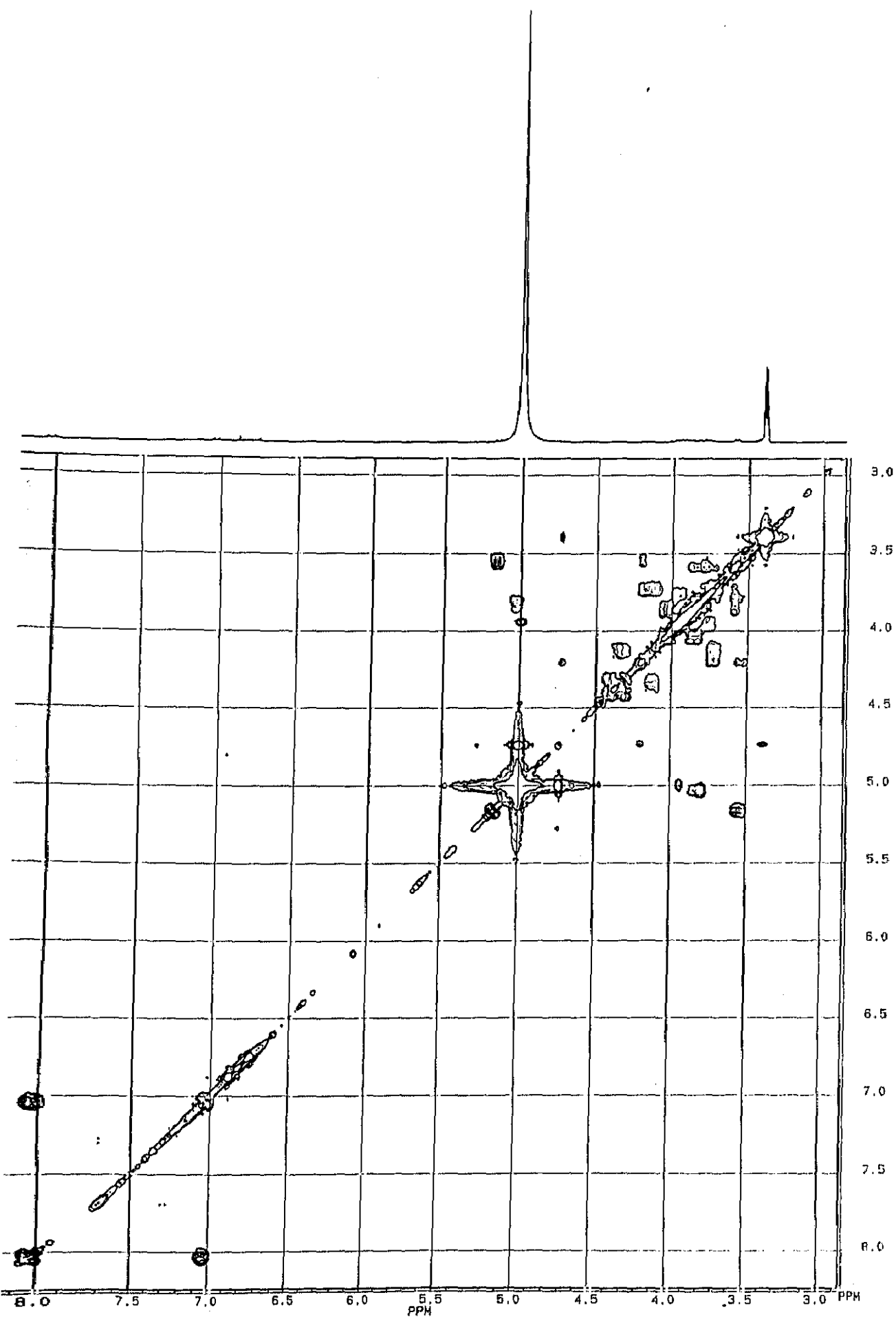
SF 62.896
SY 62.0
Q1 2560.705
SI 65536
TD 65536
SW 13513.514
HZ/PT .412

PW 0.0
PD 0.0
AQ 2.425
RG 400
NS 30000
TE 297

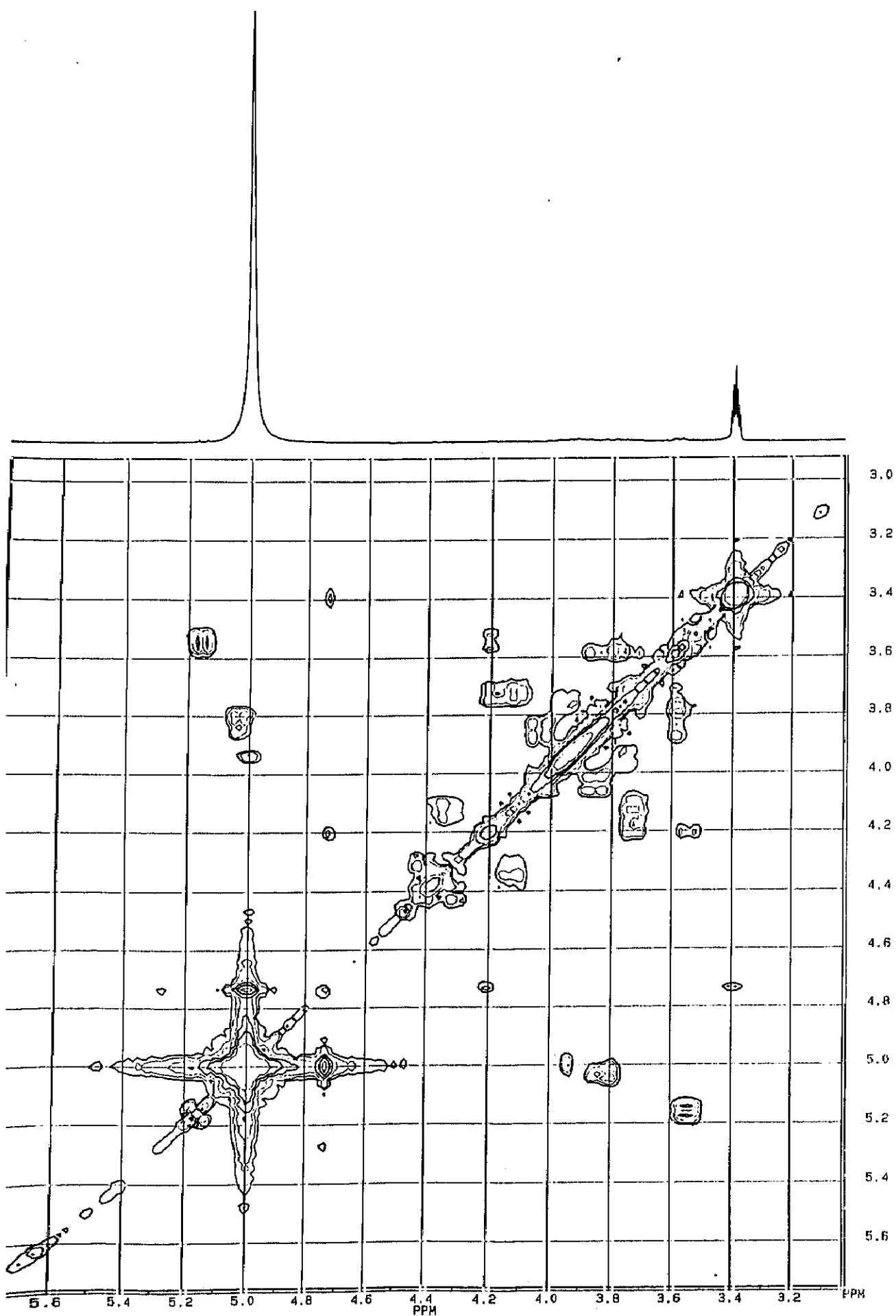
FW 16900
Q2 5206.105
DP 17H D0

LB 1.000
GB 0.0
CX 35.00
CY 10.00
F1 89.120P
F2 54.395P
HZ/CM 62.402
PPM/CM .992
SR -3904.02

5: Ampliación del espectro inicial de ^{13}C -RMN de F1



6: Espectro H-H COSY Solvente: CD₃OD



7: Ampliación del espectro H-H COSY

La estructura de isoscutelareína (8-hidroxiapigenina) se confirmó con el espectro de ^1H -RMN, en el que se observan dos dobletes indicativos de un acoplamiento *orto* ($J=8,3\text{Hz}$) a δ 8,02 y δ 7,03 que se asignan a los protones 2',6' y 3',5', respectivamente. Adicionalmente se observan dos singletes a δ 6,88 y δ 6,74, correspondientes a los protones 6 y 3. Los desplazamientos químicos de los protones 2' y 3' hacia δ 8,02 y δ 7,03 son indicativos de un agrupamiento hidroxilo libre no unido a azúcar en posición 4'.

La comparación de los datos del espectro ^{13}C (Tabla 4.40) con los datos de 8-hidroxiapigeninas glicosiladas en posición 7, permite sugerir una localización del resto azucarado en dicha posición 7.

La señal en el espectro ^{13}C a δ 84 corresponde al carbono 2 de un resto xililo y es indicativa de la presencia de un disacárido en el cual el carbono anomérico del resto xililo está unido a la aglicona, mientras que su carbono 2 está unido a una segunda unidad glicosídica.

Los valores de ^{13}C para el carbono anomérico tanto del resto xililo como del otro resto glicosídico a δ 103,7 y δ 102,9 sugieren para ambos esqueletos un sistema de piranosa con uniones tipo β . Esto se confirma con el espectro ^1H , en el cual se observan dos dobletes para los protones anoméricos hacia δ 5,15 (glucosa) y δ 5,03 (xilosa), con constantes de acoplamiento grandes, de 8,3 y 6,9 Hz, respectivamente.

La asignación de las señales glicosídicas del espectro ^1H -RMN está basada en experimentos de correlación bidimensional H-H (COSY H-H).

La posición de los azúcares y su forma de unión se pudieron confirmar con experimentos NOE de diferencia, reflejados en la figura 21, como sigue:

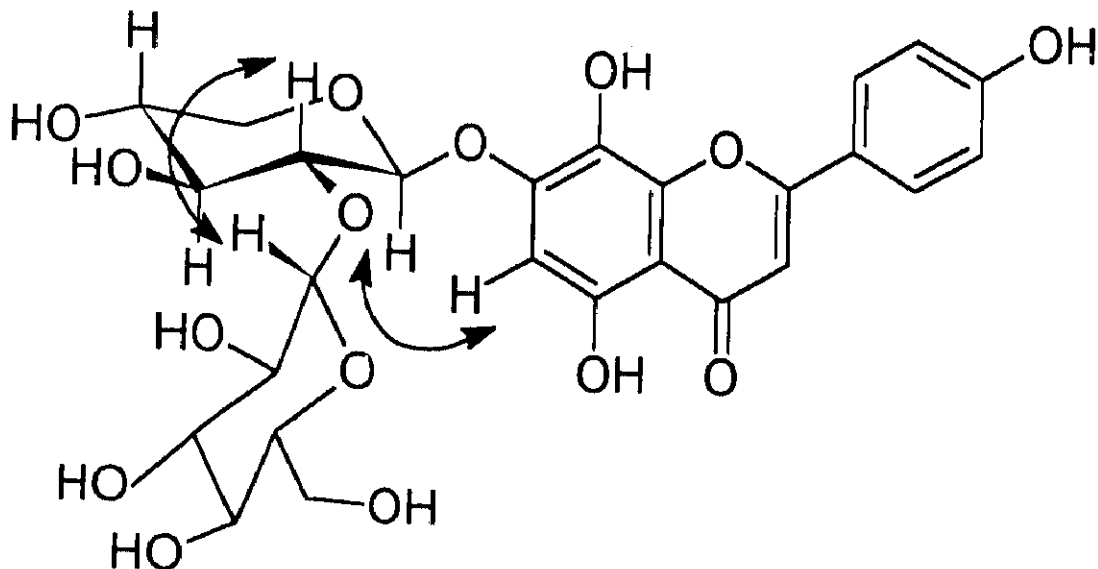


Figura 21

a) Se observaron efectos NOE entre el protón anomérico del resto xililo (δ 5,03) y el protón de la posición 6 de la 8-hidroxiapigenina (δ 6,88); ello es indicativo de que la xilosa se une al oxígeno del carbono 7 de la 8-hidroxiapigenina, como azúcar interno.

b) Se observaron efectos NOE entre el protón δ 3,8, correspondiente a la posición 2 de la xilosa, y el protón anomérico de la glucosa; ello confirma que el disacárido es una glucopiranosil (1 \rightarrow 2) xilopiranososa.

De los datos anteriormente expuestos, se confirma que nuestra molécula se trata de un **Isoscutelareína-7-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2) β -D-xilopiranosido]**.

Su estructura química se representa en la Figura 22

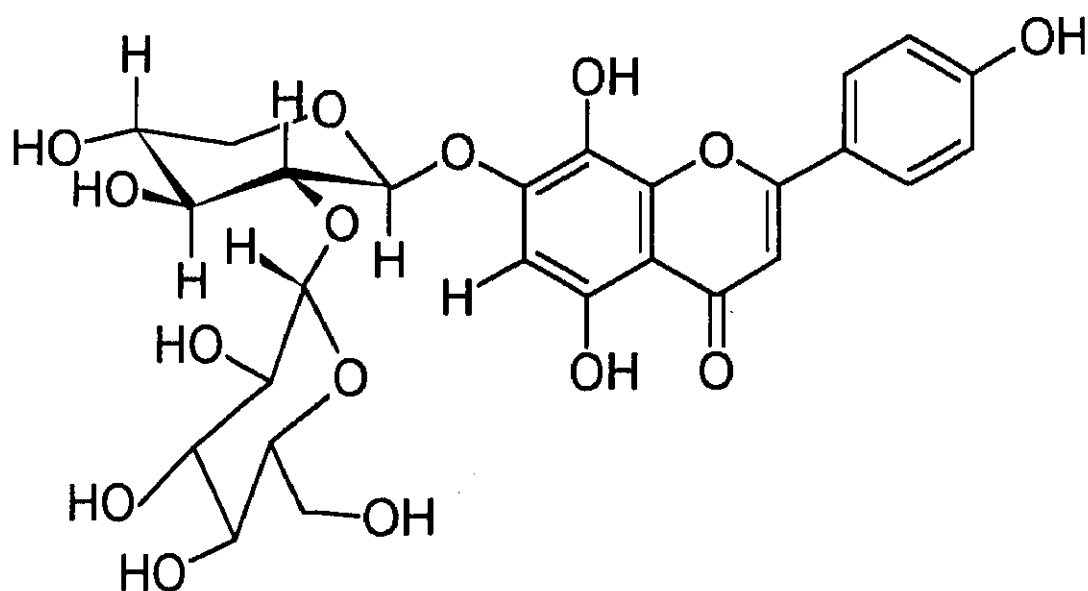


Figura 22

V.- DISCUSIÓN

1.- Al abordar el estudio del contenido en flavonoides en las dieciséis especies del Género *Sideritis*, se intentó, como primer paso, encontrar el mejor procedimiento de extracción, es decir, aquel con el que se consiguieran extraer la mayor cantidad de los flavonoides presentes en las especies, tanto en su variedad como en su porcentaje.

Después de analizados cuidadosamente los diferentes procedimientos reseñados en la bibliografía y con nuestra experiencia personal, decidimos realizar una extracción secuencial.

El fraccionamiento de cada una de las especies en cinco extractos por disolventes de polaridad creciente permite un análisis más completo del contenido en flavonoides, ya que estos se van separando según su mayor o menor polaridad y, por tanto, afinidad por determinado solvente.

Los extractos hexánicos contienen como flavonoides principales todos aquellos que poseen grupos metoxilo y que son, por tanto, muy apolares: crisoeriol, gardenina D, 8-metoxicirsilineol y desmetilnobiletina, aunque no aparecen en todas las especies. También presentan pequeñas cantidades de los flavonoides polares isoscutelareín-7-O-alosil (1→2) glucósido y luteolina, probablemente debido a una extracción demasiado prolongada con el disolvente.

El extracto etéreo de las dieciséis especies es muy rico en flavonoides metoxilados (sideritoflavona, xantomicrol, gardenina D, 8-metoxicirsilineol y desmetilnobiletina), aunque, al igual que en los extractos anteriores, aparecen pequeñas cantidades de los flavonoides polares isoscutelareín-glucósido, luteolina e hypolaetina-8-glucósido.

Todos los extractos acetato de etilo contienen isoscutelareín-7-[O-alosil (1→2)] glucósido, luteolina y F1 (este último no está presente en *Sideritis biflora* y *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis*), siendo luteolina el que se encuentra en mayor proporción en todas las especies. En aquellas especies cuyos extractos etéreos contenían flavonoides apolares, se observan trazas de los mismos en estos extractos.

El estudio de los extractos butanólico y acuoso revela que ambos son similares cualitativamente, siendo la concentración de flavonoides más elevada en el primero. En ambos casos, los únicos flavonoides que aparecen son isoscutelareína-7-glucósido, luteolina y F1.

Estos resultados nos llevan a proponer una secuencia de extracción más corta en cuanto al número de disolventes; partiremos de un disolvente apolar como el hexano, siguiendo con un disolvente de mayor polaridad como el éter etílico y finalizando la extracción con un disolvente muy polar como butanol o metanol.

2.- Si la elección de solventes es fundamental en la extracción de principios activos, otro punto que es necesario considerar es la temperatura a la cual debe realizarse la misma. En general, la extracción con calor favorece el arrastre de compuestos, además de acortar notablemente el tiempo del proceso; sin embargo, se corre el riesgo de perder aquellos compuestos termolábiles que, con una elevada sensibilidad al calor, sufren transformaciones o degradaciones bajo la acción de temperaturas elevadas.

En nuestro caso, hemos comparado los resultados obtenidos tras la extracción en frío (en percolador con maceración) y caliente (en soxhlet) de las drogas. Comprobamos, tras el análisis realizado por CCF, que el extracto obtenido en frío presenta mayor variedad de compuestos que el segundo, con un porcentaje de los mismos que es equivalente, por lo cual es el método de extracción elegido para este estudio.

3.- Es de destacar la utilidad de la cromatografía en capa fina como técnica de análisis previo de los extractos, ya que nos da una idea, tanto de su composición (naturaleza de los principios activos) como de la riqueza e identidad (por comparación con los R_f de patrones puros) de los compuestos flavónicos presentes.

Así, variando las fases móviles y utilizando distintos patrones puros, se obtiene una aproximación bastante exacta a la composición real de los diferentes extractos.

Aunque el método utilizado sólo es cualitativo, también nos ofrece una idea de la proporción en que las distintas sustancias se encuentran en cada extracto (atendiendo a la

intensidad de las manchas resueltas).

4.- Partiendo de los métodos de análisis de flavonoides por HPLC recogidos en la bibliografía, se han realizado una serie de modificaciones con el objeto de mejorar la resolución de los mismos.

Así, se comenzó probando una elución isocrática con los solventes A: Agua: Acido fórmico (98:2) y B: Acetonitrilo; sin embargo, la similitud entre las polaridades de varios flavonoides impedía su correcta separación. De este modo, pasamos a utilizar una elución en gradiente, comenzando con el 70% de A y terminando con el 30% en 20 min, lo que permitió una mejor resolución de los picos más próximos.

En los primeros análisis se empleó un detector de luz UV de longitud de onda variable operando a 360 nm; posteriormente pasamos a utilizar un detector diodo array a 254 nm por sus mayores prestaciones, tales como la evaluación de la pureza de los picos eluidos por superposición de los espectros obtenidos correspondientes al inicio, altura máxima y final de cada pico. Además, este detector permite evaluar la eficacia del método en la correcta separación de todos los componentes, ya que la lectura de la absorbancia de los espectros nos indica si estos corresponden a un solo compuesto y, por lo tanto, éste es puro.

Sin embargo, a 254 nm el ácido fórmico presentaba una elevada absorbancia que interfería con la de los compuestos flavónicos de las muestras. Por lo tanto, decidimos introducir el ácido acético en vez del ácido fórmico como modificador ácido, ya que resulta tan eficaz como el segundo en cuanto a la supresión de la cola de los picos y supone la ventaja de no interferir en el análisis por no presentar absorción a esta longitud de onda.

Por último, en sucesivos análisis y comenzando con una proporción del solvente A del 10% y aumentándola hasta un 100%, se realizaron variaciones en el gradiente hasta obtener una composición final, que fue aquella con la cual se obtuvo mejor resolución de los picos y se empleó para el estudio final de los extractos.

Las mismas condiciones de análisis por HPLC analítica, con la única variación del flujo y volumen inyectado, fueron empleadas para el estudio por HPLC semipreparativa del extracto acetato de etilo de *Sideritis luteola*, con el fin de obtener cantidad suficiente del flavonoide denominado F1 para su posterior elucidación estructural por RMN.

El método de análisis puesto a punto nos ha permitido, con una composición de la fase móvil sencilla y económica, obtener una buena resolución de los flavonoides en estudio; esto, unido a un corto tiempo de análisis (20min) y a una alta reproducibilidad, hace que el método sea óptimo para el análisis de extractos vegetales, tan complejos y difíciles de resolver, siendo clave para el estudio de especies del Género *Sideritis*, género tan controvertido en su clasificación por la gran cantidad de hibridaciones que presenta.

5.- Se ha aislado por HPLC semipreparativa a partir del extracto acetato de etilo de *Sideritis luteola* el compuesto denominado F1: 8-hidroxiapigenín-7-O-[β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosido], compuesto no descrito con anterioridad y presente en todas las especies estudiadas excepto en *Sideritis biflora* y *Sideritis pusilla ssp almeriensis*.

Dadas las características del compuesto aislado y su similitud estructural con aquellos flavonoides con probada acción antiinflamatoria, consideramos interesante proponer el estudio farmacodinámico del mismo, con objeto de comprobar si éste también posee esta actividad.

6.- Hemos conseguido, tras el análisis por HPLC de todos los extractos, aportar por primera vez para estas especies, tanto la distribución de los flavonoides que contiene cada una de ellas, como el porcentaje total de cada uno en la planta. Este dato tan importante nos permite diferenciar claramente dos grupos dentro de las dieciséis especies estudiadas; en el primero se incluyen aquellas que contienen fundamentalmente flavonoides polares, encontrándose únicamente trazas de las apolares: *Sideritis foetens*, *Sideritis luteola*, *Sideritis leucantha var incana*, *Sideritis cillensis*, *Sideritis pusilla*, *Sideritis glauca* y *Sideritis incana ssp incana*.

En el segundo grupo se encuadran las especies *Sideritis almeriensis*, *Sideritis hirsuta*, *Sideritis leucantha* var *serratifolia*, *Sideritis biflora*, *Sideritis leucantha* var *incana* ssp *meridionalis*, *Sideritis bourgeana*, *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis*, *Sideritis ibanyezii* y *Sideritis pusilla* ssp *pusilla* var *granatensis*, las cuales, aún presentando mayor riqueza en flavonoides polares, poseen una cantidad apreciable de los apolares.

Esta división coincide plenamente con la encontrada en la bibliografía y que atribuye una mayor abundancia de uno u otro tipo de flavonoides a las distintas especies según la subsección (dentro de la sección *Sideritis*) a la que correspondan.

Además, los resultados obtenidos nos permiten corroborar la importancia desde el punto de vista quimiotaxonómico, ya expuesta por algunos autores, del estudio de los flavonoides de excreción del vegetal, compuestos apolares que no se arrastran en la extracción más general de los flavonoides (realizada con metanol o etanol) y que, sin embargo, son cruciales a la hora de la clasificación botánica de la planta.

7.- De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, *Sideritis almeriensis* Pau. es sinónimo de *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis* (Pau.) H.T. Malagarriga. Sin embargo, los análisis realizados por nosotros por HPLC de ejemplares de ambas plantas, nos permiten afirmar que este dato es erróneo, ya que su composición en flavonoides es distinta tanto cuali como cuantitativamente: *Sideritis almeriensis* posee mucha menor cantidad de isoscutelareína-7-glucósido que *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis*, y presenta cantidades apreciables de sideritoflavona, xantomicrol y gardenín D, compuestos que no aparecen en la segunda especie; además, *Sideritis almeriensis* no contiene 8-metoxicirsilineol, flavonoide bastante abundante en *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis*. El contenido en desmetilnobiletina es bastante más elevado en *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis* que en *Sideritis almeriensis*.

Estas importantes diferencias en su composición química nos llevan a concluir que ambas especies no son la misma, por lo que sería necesario realizar una nueva clasificación de las mismas.

8.- Así mismo, *Sideritis biflora* Porta et Rigo se encuentra como sinónimo de *Sideritis bourgeana* Boiss. et Reut. en la bibliografía consultada. Al igual que en el caso anterior, su análisis fitoquímico nos permite diferenciar ambas especies; *Sideritis biflora* presenta un mayor contenido de isoscutelareína-7-glucósido, crisoeriol y xantomicrool, y mucho menor en luteolina; además, no contiene hypolaetina-8-glucósido ni desmetilnobiletina, flavonoides presentes en *Sideritis bourgeana*. Esta última no contiene 8-metoxicirsilineol, presente en *Sideritis biflora*.

Nuevamente, la precisión de la metodología utilizada nos ha permitido detectar errores en la clasificación ya establecida.

9.- El último objetivo propuesto para este trabajo de Tesis Doctoral era el de justificar el empleo popular de diversas especies del Género *Sideritis* como antiinflamatorio y antiulceroso atendiendo a la riqueza en su composición química de diversos flavonoides con actividad antiinflamatoria comprobada por diversos métodos experimentales.

A nivel popular se utiliza la parte aérea de la planta para realizar una infusión que será posteriormente ingerida. Una vez conocida la naturaleza de los flavonoides presentes en estas especies, podemos afirmar que los compuestos contenidos en este proceso de extracción acuosa en caliente serán aquellos flavonoides de más elevada polaridad, es decir, isoscutelareína-7-[O-alosil (1→2)] glucósido, luteolina, hypolaetina-8-O-β-D-glucósido y F1. Existen diversos trabajos que confirman la acción antiinflamatoria y antiulcerosa de isoscutelareína-7-glucósido e hypolaetina-8-glucósido, así como la acción vasodilatadora de luteolina y apigenina; por lo tanto, aquellas especies que presenten mayor contenido en estos flavonoides, serán las probablemente posean una acción más acusada.

Por lo tanto, podemos justificar el empleo popular de la infusión de *Sideritis foetens*, *Sideritis hirsuta*, *Sideritis leucantha* var *serratifolia*, *Sideritis bourgeana*, *Sideritis ibanyezii* y *Sideritis pusilla* por su elevado contenido en los flavonoides anteriormente citados, proponiendo, por el mismo motivo, las especies *Sideritis biflora*, *Sideritis leucantha* var *meridionalis*, *Sideritis pusilla* ssp *pusilla* var *granatensis* y *Sideritis cillensis* como posible fuente de los mismos.

VI.- CONCLUSIONES

1.- Tras el análisis de los resultados obtenidos para los diferentes extractos objeto de este estudio, se propone una optimización del método de extracción que consiste en una maceración y percolación en frío con disolventes de polaridad creciente, empezando con un disolvente apolar como el hexano, seguido de uno de polaridad intermedia como el éter etílico y finalizando la extracción con un disolvente muy polar como el butanol o el metanol.

Es de resaltar la utilidad de la Cromatografía en Capa Fina como técnica de apoyo en el análisis de los extractos vegetales, proporcionando una aproximación bastante exacta a su composición real.

2.- El método de análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia puesto a punto nos ha permitido, con una composición de la Fase Móvil sencilla y económica (Solvente A: Agua:Ácido acético (98:2) y Solvente B: Acetonitrilo, en una combinación de elución en gradiente e isocrático), obtener una buena resolución de los flavonoides en estudio; esto, unido a un corto tiempo de análisis (20min) y a una alta reproducibilidad, hace que el método sea óptimo para el análisis de extractos vegetales, tan complejos y difíciles de resolver, y, así mismo, es clave para el estudio de las especies del Género *Sideritis*, género tan controvertido en su clasificación por la gran cantidad de hibridaciones que presenta.

3.- Se ha aislado, por HPLC semipreparativa, un nuevo flavonoide cuya estructura ha sido elucidada por técnicas espectroscópicas de absorción UV/VIS y de Resonancia Magnética Nuclear tanto de ^1H como de ^{13}C ; este compuesto no ha sido descrito con anterioridad, y está presente en la mayoría de las especies estudiadas, siendo su estructura química la siguiente: Isoscutelareín-7-O- $[\beta\text{-D-glucopiranosil (1}\rightarrow\text{2) } \beta\text{-D-xilopiranosido}]$.

4.- Consideramos como flavonoides marcadores en las especies estudiadas: Isoscutelareín-7-O-alosil- β -D-glucósido, Luteolina, Hypolaetina-8-O- β -D-glucósido, Ccristoeriol, Sideritoflavona, Gardenina D y Desmetilnobiletina, por encontrarse en prácticamente la totalidad de las especies estudiadas y, casi siempre, en cantidad apreciable.

Esto nos permite:

a) Establecer una diferenciación de las dieciséis especies estudiadas en dos grupos, según su mayor o menor abundancia en los distintos tipos de flavonoides.

En el primero se incluyen aquellas que contienen fundamentalmente flavonoides polares, encontrándose únicamente trazas de los apolares: *Sideritis foetens*, *Sideritis luteola*, *Sideritis leucantha* var *incana*, *Sideritis cillensis*, *Sideritis pusilla*, *Sideritis glauca* y *Sideritis incana* ssp *incana*.

En el segundo grupo se encuadran las especies *Sideritis almeriensis*, *Sideritis hirsuta*, *Sideritis leucantha* var *serratifolia*, *Sideritis biflora*, *Sideritis leucantha* var *incana* ssp *meridionalis*, *Sideritis bourgeana*, *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis*, *Sideritis ibanyezii* y *Sideritis pusilla* ssp *pusilla* var *granatensis*, las cuales, aún presentando mayor riqueza en flavonoides polares, poseen una cantidad apreciable de los apolares.

b) Afirmer que la especie *Sideritis almeriensis* Pau. no es sinónimo botánico de *Sideritis pusilla* ssp *almeriensis* (Pau.) H.T. Malagarriga

c) Afirmer que la especie *Sideritis biflora* Porta et Rigo no es sinónimo botánico de *Sideritis bourgeana* Boiss. & Reut.

Una vez más, se pone de manifiesto la importancia del estudio quimiotaxonómico de las especies como contribución a la determinación botánica de las mismas.

5.- Justificamos el empleo popular de las especies *Sideritis foetens*, *Sideritis hirsuta*, *Sideritis leucantha* var *serratifolia*, *Sideritis bourgeana*, *Sideritis ibanyezii* y *Sideritis pusilla* atendiendo a su contenido en flavonoides con probada acción antiinflamatoria.

Creemos necesario reseñar la conveniencia de comprobar la correlación entre el contenido en flavonoides y el de terpenoides y la actividad farmacológica de estas especies, de manera que, en un futuro, mediante un simple análisis fitoquímico de la planta, se pueda conocer de antemano su potencia de acción farmacológica.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

ABDEL SATTAR,A.; BANKOVA,V.; SPASSOV,S.; DUDDECK,H.- Flavonoid glycosides from *Sideritis* species. Fitoterapia, 64 (3), 278-279 (1993)

ADZET,T.; CAÑIGUERAL,S.; IBÁÑEZ,C.; VILA,R.- Essential Oil of *Sideritis reverchonii*. Herba. Hung. 28 (3), 59-62 (1989)

ADZET,T.; CAÑIGUERAL,S.; MONASTERIO,I.; VILA,R.; IBÁÑEZ,C.- The Essential Oil and Polyphenols of *Sideritis hyssopifolia* var. *pyrenaica*. J. Essent. Oil Res., 2 (3), 151-153 (1990)

AL-HAZIMI, HASSAN M.G.; MIANA,G.A.- Diterpenoid of Labiatae. III.Diterpenes from *Sideritis* species. J. Chem.Soc. Pak., 9 (1), 143-166 (1987)

ALCARAZ,M.J.; GASCÓ,M.A.; HOULT,J.R.S.; VILLAR,A.- Hypolaetin-8-glucoside and prostaglandin pathways in the rabbit kidney. Eur. Rev. Med. & Pharmacol. Sci., 7 (1985)

ALCARAZ,M.J.; VILLAR,A.- Effect of Borjatriol on the synthesis of prostaglandins. Pharmazie (1987)

ALCARAZ,M.J.; HOULT,J.R.S.- Effects of Hypolaetin-8-glucoside and related flavonoids on soybean lipoxigenase and snake venom phospholipase A2. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 278 (1), 4-12 (1985)

ALCARAZ,M.J.; ESPLUGUES,J.; VILLAR,A.- Activité pharmacodynamique de *Sideritis mugronensis*. II.- Action sur la pression artérielle. étude sur organe isolé. Plantes médicinales et Phytothérapie, 16 (2), 147-156 (1982)

ALCARAZ,M.J.; GARCÍA-OCHOA,S.; JIMÉNEZ,M.J.; VALVERDE,S.; VILLAR,A.- A derivate of ent-13-epi-manoyl oxide isolated from *Sideritis javalambrensis*. Phytochem., 28 (4), 1267-1268 (1989)

ALCARAZ,M.J.; MORONEY,M.; HOULT,J.R.S.- Effects of Hypolaetin-8-O-glucoside and its aglycone in vivo and in vitro tests for antiinflammatory agents. *Planta medica*, 40-41 (1988)

ALCARAZ,M.J.; TORDERA,M.- Studies on gastric anti-ulcer activity of Hypolaetin-8-glucoside. *Phytother. Res.*,2, 85-88 (1988)

ARRIAGA,F.J.; RUMBERO,A.- Naringin, Hesperidin and Neohesperidin content in juices from thirteen *Citrus* ssp. *Fitoterapia*, 61 (1), (1990)

BALERIOLA LUCAS,C.- Tesis Doctoral, Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid (1979)

BARBERÁN,F.A.T.- The flavonoid compounds from the Labiatae. *Fitoterapia*, 17 (2), 65-95 (1985a)

BARBERÁN,F.A.T.; NÚÑEZ,J.M.- High-Performance Liquid-Chromatography of Flavones from *Sideritis*. *Phytochem.* 24 (6), 1285-1288 (1985a)

BARBERÁN,F.A.T.; NÚÑEZ,J.M.; TOMÁS,F.- An HPLC study of Flavones from some Spanish *Sideritis* species. *Phytochem.*, 24 (6), 1285-1288 (1985b)

BARBERÁN,F.A.T.; MÁNEZ,S.; VILLAR,A.- Identification of antiinflammatory agents from *Sideritis* species growing in Spain. *J. of Nat. Prod.* 50 (2), 313-314 (1987)

BARBERÁN,F.A.T.; REJDALI,M.; HARBORNE,J.; HEYWOOD, V.H.- External and Vacuolar Flavonoids from Ibero- North-African *Sideritis* species. A Chemosystematic approach. *Phytochem.*, 27 (1), 165-170 (1988)

BARBERÁN,F.A.T.; TOMÁS,F.- An allose containing 8-hydroxychrisoeriol diglycoside from *Sideritis leucantha*. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 16 (1), 47-50 (1985c)

BARBERÁN,F.A.T.; TOMÁS,F.; FERRERES,F.- Two Flavone glycosides from *Sideritis leucantha*. *Phytochem.*, 23 (9), 2112-2113 (1984a)

BARBERÁN,F.A.T.; TOMÁS,F.; FERRERES,F.- Thin-Layer chromatographic behaviour and chemical structure of 6- and 8-methoxy-5-hydroxyflavones.*J. of Chromatog.*, 315, 101-109 (1984b)

BARBERÁN,F.A.T.; TOMÁS,F.; FERRERES,F.- Isoscutelarein-7-O-[allosyl (1→2) glucoside] from *Sideritis leucantha*. *J. Nat. Prod.*, 48 (1), 28-32 (1985d)

BARBERÁN,F.A.T.; TOMÁS,F.; HERNÁNDEZ,L.; FERRERES,F.- Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of 5-hydroxyflavones bearing tri- or tetrasubstituted A rings. *J. of Chromatog.* 347, 443-446 (1985e)

BI-HUANG,H.; LI-DONG,Z.; YONG-LONG,L.- New tetrasaccharide Flavonol Glycoside from *Epimedium acuminatum*. *J. of Nat. Prod.*, 55 (5), 672-675 (1992)

BIANCHINI,J.P.; GAYDOU,E.M.- Separation of polymethoxylated flavones by Straight-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. of Chromatog.* 190, 233-236 (1980)

BRASSEUR,T.; ANGENOT,L.- Choice of Reagents for the detection of Flavonoids: Aminoethanol diphenylborate-PEG 400 mixture. *Bull. Liaison- Groupe Polyphenols*, 13, 139-141 (1988)

BRUNETON,J.- *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia, S.A. (1991)

CABRERA,E.; GARCÍA-GRANADOS,A.; QUECUTY,M.A.- Terpenoids from *Sideritis varoi*. *Phytochem.*, 27 (1), 183-185 (1988)

DAIGLE,D.J.; CONKERTON,E.J.- High-Performance Liquid-Chromatography of 34 selected Flavonoids. *J. of Chromatogr.* 240, 202-205 (1982)

DARÍAS,V.; BRAVO,L.; RABANAL,R.; SÁNCHEZ-MATEO,C.C.; MARTÍN-HERRERA,D.A.- Cytostatic and antibacterial activity of some Compounds isolated from several Lamiaceae species from the Canary Islands. *Planta med.*, 56 (1), 70-72 (1990)

DENNIS CLARK,W.; WOLLENWEBER,E.- Flavonoid aglycones in the resin of *Hazardia squarrosa* var. *grindeltoides*. *Phytochem.* 24 (5), 1122-1123 (1985)

DÍAZ,R.M.; GARCÍA-GRANADOS,A.; MORENO,A.; MORENO,E.; PARRA,A.; QUEVEDO-SARMIENTO,J.; SÁENZ DE BURUAGA,A.; SÁENZ DE BURUAGA,J.M.- Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of Diterpenoid compounds from *Sideritis*. *Planta medica*, 54 (4), 301-304 (1988)

DONDI,F.; BLO,G.; KAHIE,Y.D.; LODI,G.; PIETROGRANDE,C.; RESCHIGLIAN,P.- Chromatographic Behaviour of Flavonoid Compounds in Reversed-Phase HPLC Systems. *Chromatographia* 25 (5), 423-429 (1988)

DONDI,F.; KAHIE,Y.D.; LODI,G.; BLO,G.; PIETROGRANDE,C.; RESCHIGLIAN,P.- Solvent Selectivity effects in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Flavonoid Compounds. *J. of Chromatogr.* 461, 281-292 (1981)

DUARTE,J.; PÉREZ VIZCAÍNO,F.; UTRILLA,P.; JIMÉNEZ,J.; TAMARGO,J.; ZARZUELO,A.- Vasodilatory effects of Flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-Activity relationships. *Gen. Pharmac.*, 24 (4), 857-862 (1993)

ESPLUGUES,J.; VILLAR,A.; ALCARAZ,M.J.- Activité pharmacodynamique de *Sideritis mugronensis*. I.- Toxicité et action sur le S.N.C.. *Plantes médicinales et Phytothérapie*, 16 82), 137-146 (1982)

FERNANDES,A.- *Farmacognosia*, Vol.II, 2ª Ed.

FERNÁNDEZ,C.; FRAGA,B.M.; HERNÁNDEZ,M.G. Diterpenes from *Sideritis nutans*. *Phytochem.*, 25, 2825-2827 (1986)

FERNÁNDEZ,C.; FRAGA,B.M.; HERNÁNDEZ,M.G.; ARTEAGA,J.M.- Flavonoid aglycones from some Canary Islands species of *Sideritis*. J.of Nat.Prod. 51 (3), 591-593 (1988)

FERRERES,F.; TOMÁS-LORENTE,F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.- Biochemical Identification of *Sideritis serrata* x *S. bourgeana* Hybrids by HPLC Analyses of Flavonoids. Z. Naturforsch. 44c, 568-572 (1989)

FERRERES,F.; TOMÁS-LORENTE,F.; TOMÁS-BARBERÁN,F.A.- Chemotaxonomic study of *Sideritis spinulosa*, *S. linearifolia*, *S. spinulosa* x *S. linearifolia*, and *S. linearifolia* x *S. spinulosa*. An. Quim. Ser. C, 83 (3), 356-357 (1987)

FONT QUER,P.- Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. (1962)

FRAGA,B.M.; GUILLERMO,R.; HERNÁNDEZ,M.G.; MESTRES,T.; ARTEAGA,M.J.- Diterpenes from *Sideritis canariensis*. Phytochem., 30 (10), 3361-3364 (1991)

FRANCO, T.T.; KUREBAYASHI,A.K.- Isolation of Propolis drugs by 2-dimensional paper chromatography and spectrometric determination. Rev. Inst. Adolfo Lutz , 46 (1-2), 81-86 (1989)

GABRIELI,C.; KOKKALOU,E.- A Glucosylated acylflavone from *Sideritis raeseri*. Phytochem., 29 (2), 681-683 (1990)

GARCÍA-ÁLVAREZ,M.C.; RODRÍGUEZ,B.- Diterpenoids from *Sideritis* (43). Diterpenoids from *Sideritis foetens*. Phytochem., 19, 2405-2407 (1980)

GARCÍA-GRANADOS,A.; LIZANA,F.; MARTÍNEZ,A.; ONORATO,M.E.; SÁENZ DE BURUAGA,A.; SÁENZ DE BURUAGA,J.M.; SOCORRO,O.- Diterpenos de *Sideritis lacaitae* Font Quer, *Sideritis almeriensis* Pau, *Sideritis granatensis* (Pau) Font Quer sp. *nijarensis* O. Socorro & I. Tárrega, *Sideritis zafræ* O. Socorro y *Sideritis leucantha* Cav. var *incana* Font Quer. An. Quím., Serie C, 79 (3), 460-461 (1983)

GARCÍA-GRANADOS,A.; MARTÍNEZ,A.; MOLINA,A.; ONORATO,M.; SÁENZ DE BURUAGA,J.M.- Terpenic components of Spanish Labiatae. Part 19. Diterpenoids from *Sideritis varoi ssp cuatrecasii*: Carbon-13 NMR of ent-epi-manoyl oxides functionalized at C-12. *Phytochem.*, 24, 1789-1792 (1985)

GARCÍA-GRANADOS,A.; MARTÍNEZ,A.; ONORATO,M.E.- Terpenic components of Spanish Labiatae. Part 20. Diterpenoids from *Sideritis arborescens ssp paulii*. *Phytochem.*, 24, 517-521 (1985)

GARCÍA-GRANADOS,A.; MARTÍNEZ,A.; ONORATO,M.E.; SOCORRO,O.- Diterpenoids from *Sideritis pusilla subsp. flavovirens*. *Phytochem.*, 23 (3), 607-610 (1984)

GARCÍA-GRANADOS,A.; MOLINA,A.- New aromadendranic sesquiterpenes from *Sideritis varoi ssp cuatrecasii*. *Can. J. Chem.*, 67 (8), 1288-1292 (1989)

GARCÍA-GRANADOS,A.; PARRA,A.; PEÑA,A.; SAENZ DE BURUAGA,A.; SAENZ DE BURUAGA,J.M.- Terpenic components of Spanish Labiatae (IV); new diterpenic acetates from *Sideritis pusilla* (Lge) Pau. subspecies. *An. Quim. Ser. C*, 77 81), 19-21 (1982)

GARCÍA-GRANADOS,A.; PARRA,A.; PEÑA,A.; SAENZ DE BURUAGA,A.; SAENZ DE BURUAGA,J.M.; VALVERDE,S.- Terpenic components of Spanish Labiatae (VII). Minor components from *Sideritis pusilla* (Lge.) Pau. subspecies. *An. Quím., Serie C*, 77, 48-51 (1981)

GARCÍA-GRANADOS,A.; PARRA,A.; PEÑA,A.; SOCORRO,O.- Terpenoid components of Spanish Labiatae (X); diterpenes from *Sideritis pusilla* (Lange) Pau. var *flavovirens* (Rouy) Malagarriaga and *Sideritis leucantha* Cav. *flavovirens* Rouy. *An. Quím., Ser. C*, 80 (2), 175-177 (1985)

GARCÍA-GRANADOS,A.; SÁENZ DE BURUAGA,A.; SÁENZ DE BURUAGA,J.M.; SOCORRO,O.- Componentes terpénicos de Labiadas españolas: Diterpenos de *Sideritis granatensis* (Pau) Font Quer. *An. Quím., Serie C*, 80 (2), 172-174 (1984)

GERGIS,V.; SPILIOTIS,V.; ARGYRIADOU,N.; POULOS,C.- Relation between the antimicrobial activity and the chemical composition of the Essential Oil of *Sideritis sipylea* Boiss. (Labiatae). Flavour. Fragrance J., 6 (1), 93-95 (1991)

GERGIS,V.; ARGYRIADOU,N.; POULOS,C.- Composition of the Essential Oils of *Sideritis clDESTINA* ssp *cyllenea* and *Sideritis sipylea*. J. Sci. Food Agric., 47, 501-507 (1989)

GIL MUÑOZ,M.I.- Elucidación de estructuras de flavonoides potencialmente activos. Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, 1983

GIL,M.I.; FERRERES,F.; MARRERO,A.; TOMÁS-LORENTE,F.; TOMÁS-BARBERÁN,F.A.- Distribution of Flavonoid aglycones and glycosides in *Sideritis* species from the Canary Islands and Madeira. Phytochem., 34 (1), 227-232 (1993)

GÓMEZ-SERRANILLOS CUADRADO,P.- Estudio analítico de Oripaviina e inicio a su Farmacología. Tesis Doctoral, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, 1992

GONZÁLEZ,A.G.; FRAGA,B.M.; HERNÁNDEZ,M.G.; LARUGA,F.; LUIS,J.G.; RAVELO,A.G.- Flavones from some Canary Islands species of *Sideritis*. Lloydia 41 (3), 279 (1978)

GONZÁLEZ,A.G.; FRAGA,B.M.; HERNÁNDEZ, M.G.; LUIS,J.G.; LARUGA,F.- Constituents of the Labiatae (28). Comparative Phytochemistry of the Genus *Sideritis* from the Canary Islands. Biochem. Syst. Ecol., 7, 115-120 (1979)

GRANADOS,A.G.; MARTÍNEZ,A.; ONORATO,M.E.; SOCORRO,O.- Terpenoid components of Spanish Labiatae. Part 15. Diterpenoids from *Sideritis pusilla* ssp *flavovirens*. Phytochem., 23 (3), 607-610 (1984)

GUANGYI,X.- Applications of NMR in the studies of Natural Pharmaceuticals. Fenxi Ceshi Tongbao, 7 (6), 6-13 (1988)

HARBORNE,J.B.- "Function of Flavonoids" en Comparative Biochemistry of Flavonoids. Academic Press, 280-283 (1967)

HARBORNE,H.J.; WILLIAMS,C.A Flavone and Flavonol glycosides en The Flavonoids, 303-325, Ed. J.B.Harborne (1988)

HAVSTEEN,B.- Flavonoids, a class of Natural Products of high pharmacological potency. Biochem. Pharmacol. 32 (7), 1141-1148 (1983)

HEIMLER,D.; BODDI,V.- Cluster analysis in the comparison of two-dimensional chromatograms. J. Chromatogr., 466, 371-378 (1989)

HERAS POLO,B.- Farmacología de *Sideritis javalambrensis* Pau: Aislamiento de nuevos principios antiinflamatorios y estudio de su actividad. Tesis Doctoral, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, UCM (1992)

HERAS,B., de las ; VILLAR,A.; VIVAS,J.M.; HOULT,J.R.S.- Novel Anti-inflammatory Plant Labdanes: Comparison of in vitro properties with Aspirin and Indomethacin. Agents Actions, 41 (1-2), 114-117 (1994)

HERAS,B., de las ; VIVAS,J.M.; VILLAR,A.- Anti-inflammatory activity of *Sideritis javalambrensis* in rats. Planta medica, 56 (6), 658-659 (1990)

HIRAOKA,A.; YOSHITAMA,K.; HINE,T.; TATEOKA,T.; TATEOKA,T.N.- Isotachopheresis of Flavonoids. Chem. Pharm. Bull., 35 (10), 4317-4320 (1987)

HLADOVEC,J.- Antithrombotic effects of some Flavonoids alone and combined with Acetylsalicylic acid. Arzneim. Forsch, 27, 1989-1992 (1977)

HOSTETTMANN, M.; GAFNER,F.; MARSTON,A.; SHAUFELBERGER,D.;
HOSTETTMANN,K.- Rapid analysis of polyphenolic compounds in crude plant extract by
HPLC using a UV/VIS Ddiode Array Detector. Bull. Liaison. Groupe Polyphenols, 13, 121-
127 (1988)

HOSTETTMANN,K.; HOSTETTMANN,M.- En "The Flavonoids. Advances in Research".
Ed. J.B. Harborne y T.J. Mabry, Chapman y Hall, Londres, 1-18 (1982)

HOSTETTMANN,K.; MARSTON.A.- Isolation, Purification and Characterization of
Flavonoids. Prog. Clin. Biol. Res., 213, 43-51 (1986)

JAGOTA,N.K.; CHEATHAM,S.T.- HPLC separation of Flavonoids and Flavonoid glycosides
using a Polystyrene/Divinilbenzene column. J. of Liquid Chromatog. 15 (4), 603-615 (1992)

JIMÉNEZ GONZÁLEZ,M.J.- Aislamiento de principios antiinflamatorios de *Sideritis*
javalambrensis Pau. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, 1988

JIMÉNEZ,M.J.; ALCARAZ,M.J.; FERRÁNDIZ,M.L.; VILLAR,A.- Anti-inflammatory
activity of a Flavonoid from *Sideritis leucantha*. Planta medica, 52, 541 (1986)

JIMÉNEZ,A.; MÁÑEZ,S.; VILLAR,A.- Seasonal variation of Borjatriol, an antiinflammatory
Diterpenoid from *Sideritis mugronensis*. Pharmazie, 45 (4), 295-296 (1990)

KINGSTON,D.G.I.- High-Performance Liquid-Chromatography of Natural Products. J. of
Nat. Prod. 42 (3), 237-260 (1979)

KIRIMER,N.; BASER,K.H.C.; TUMEN,G.; SEZIK,E.- Characterization of the Essential Oil
of *Sideritis dichotoma*. J. Essent. Oil Res., 4 (6), 641-642 (1992)

KIRIMER,N.; KOCA,F.; BASER,K.H.C.; OZEK,T.; TANRIVERDI,H.; KAYA,A.-
Composition of Essential Oils from two subspecies of *Sideritis germanicopolitana* Bornm. J.
Essent. Oil Res., 4 (5), 533-534 (1992)

KRAUSE,M.; GALENSA,R.- Direct enantiomeric separation of racemic flavanones by High-Performance Liquid Chromatography using cellulose triacetate as a chiral stationary phase. J. of Chromatog. 441 (2), 417-422 (1989)

LÓPEZ-PARRIEGO,J.L.- Tesina de Licenciatura. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, UCM.(1991)

LORENTE,F.T.; FERRERES,F.; GUIRADO,A.; TROWITSCH,W.- Flavones from *Sideritis leucantha*. An. Quím. Serie C, 79 (1), 96-98 (1983)

LUNDER,T.L.- Flavonoids of Herb Teas: Possible relationship between analysis and physiological effects. Bull. Liaison- Groupe Polyphenols, 13, 601-604 (1988)

LLOPIS MARÍ,A.; LLOPIS GONZÁLEZ,J.- Flora silvestre valenciana. Valencia, 1978

MABRY,T.J.; MARKHAM,K.R.; THOMAS,M.B.- The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, Nueva York (1970)

MÁÑEZ,S.; DOMÍNGUEZ,A.B.; BARBERÁN,F.A.T.; VILLAR,A.- Flavone glycosides of *Sideritis incana*. Planta medica, 6, 525 (1986)

MAÑEZ,S.; JIMÉNEZ,A.; VILLAR,A.- Seasonal variation of Hypolaetin-8-glucoside in *Sideritis mugronensis* Borja. Phytother. Res., 4 (3), 124-125 (1990)

MÁÑEZ,S.; JIMÉNEZ,A.; VILLAR,A.- Volatiles of *Sideritis mugronensis* flower and leaf. J. Essent. Oil Res., 3 (6), 295-397 (1991)

MARKHAM,K.R.- Techniques of Flavonoid identification. Academic Press, 1982

MARTÍN-LOMAS,M.; RABANAL,R.M.; RODRÍGUEZ,B.; VALVERDE,S.- Glicósido de flavonoide aislado de *Sideritis hirsuta*. An. Quím., Serie C, 79, 230-231 (1983)

MATEO,C.; CALDERÓN,J.; SANZ,J.- Essential Oil of some *Sideritis* species from Central and Southern Spain. *Phytochem.* 27 (1), 151-153 (1988)

MATEO,C.; SANZ,J.; CALDERÓN,J.- Essential Oil of *Sideritis hirsuta*. *Phytochem.*, 22, 171-173 (1983)

MATEO,C.; SANZ,J.; CALDERÓN,J.- Essential Oil of some Eastern Spain *Sideritis*. *Phytochem.*, 23, 319-322 (1984)

MORTON,J.F.- Mucilaginous Plants and their use in Medicine. *J. of Ethnopharmacol.*, 29, 245-266 (1990)

PALLARÉS NAVARRO,A.- Contribución al conocimiento del Género *Sideritis* L. (Lamiaceae) en Almería. Cuadernos monográficos. Instituto de estudios almerienses de la Diputación de Almería (1990)

PATHAK,D.; PATHAK,K.; SINGLA, A.K.- Flavonoids as medicinal agents - Recent advances. *Fitoterapia*, 62 (5), 371-389 (1991)

PIETROGRANDE,M.C.; RESCHIGLIAN,P.; DONDI,F.; DUALE KAHIE,Y.; BERTOLASI,V.- Correlations between high-performance liquid chromatographic retention, X-ray structural and ¹³-C NMR spectroscopic data of flavonoid compounds. *J. of Chromatogr.*, 592, 65-73 (1992)

Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity relationships. Proceedings of a Symposium. Buffalo, New York. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 213, 1-592 (1986)

RABANAL,R.M.; VALVERDE,S.; MARTÍN-LOMAS,M.; RODRÍGUEZ,B.; CHARI,U.M.- Chrysoeriol-7-(2''-O-β-D-allopyranosil)-β-D- glucopiranoside from *Sideritis grandiflora*. *Phytochem.*, 21, 1830-1832 (1982)

RECIO,M.C.; RÍOS,J.L.; VILLAR,A.- A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytother. Res.*, 3 (4), 117-125 (1989)

REVILLA,E.; ALONSO,E.; ESTRELLA,M.I.- El análisis de flavonoles por HPLC . GCTA, Boletín Informativo del grupo de Cromatografía y Técnicas Afines. Real Sociedad Española de Química, 7 (1) (1986)

RÍOS,J.L.; SIMEÓN,S; JIMÉNEZ,F.J.; ZAFRA-POLO,M.C.; VILLAR,A.- Reagents for screening Medicinal Plants by Thin-Layer Chromatography. A review. *Fitoterapia*, 57 (3), 153-162 (1986)

RÍOS,J.L.; RECIO,M.C.; VILLAR,A.- Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish mediterranean area. *J. Ethnopharmacol.*, 21 (2), 139-152 (1987)

RIVERA NÚÑEZ,D.; OBÓN DE CASTRO,C.; TOMÁS-LORENTE,F.; FERRERES,F.; TOMÁS BARBERÁN,F.A.- Infrasectional systematics of the genus *Sideritis* L. section *Sideritis* (Lamiaceae). *Botanical J. of the Linnean Society*, 103, 325-349 (1990)

ROBRÍGUEZ,B.- 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone from *Sideritis mugronensis*. *Phytochem.*, 16, 800-801 (1977)

RODRÍGUEZ,B.; DE LA TORRE, M.C.- Flavonoid glycosides and a phenylpropanoid glycoside from *Sideritis perfoliata*. *Int. J. Pharmacogn.*, 30 81), 61-65 (1992)

RODRÍGUEZ,B.; MARTÍN PANIZO,F.- Flavonas de *Sideritis serrata*. *An. Quím.*, 75, 431-432 (1979)

RODRÍGUEZ,B.; VALVERDE,S.- Borjatriol, a new diterpenoid from *Sideritis mugronensis* Borja (Lamiaceae). *Tetrahedron*, 29, 2837-2843 (1973)

SAGREDO,R.- Flora de Almería. Plantas vasculares de la provincia. Colección Investigación. Instituto de Estudios Almerienses (IEA). Diputación Provincial de Almería, (1987)

SAN MARTÍN,R.- Tratado de Framacognosia, 1977

SLOWING BARILLAS,K.- Estudio de la actividad antiinflamatoria de diversas especies de la flora de Guatemala. Tesis Doctoral, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid (1992)

SOCORRO,O.- *Sideritis carbonellis* (Lamiaceae). Una nueva especie para la flora española. Studia Botanica, 1, 21-26 (1982)

SOCORRO,O.; ZAFRA,M.L.; TARREGA,I.- *Sideritis arborescens* Salzm. ex Bentham y *Sideritis x gaditana* Rouy en Andalucía Occidental. Acta Botánica Malacitana, 11, 215-220 (1986a)

SOCORRO,O.; CANO,L.; ESPINAR,M.C.- Nuevo híbrido de *Sideritis* L.: *Sx ginesii* Socorro, Cano & Espinar. Notas taxonómicas y cronológicas para la flora vascular de Andalucía y del RIF. Lagasalia, 16 (1), 116-120 (1990)

SOCORRO,O.; CANO,L.; ESPINAR,C.- Contribución a la tipificación de las especies del Género *Sideritis* L. (Labiatae). Acta Botánica Malacitana, 13, 163-170 (1988a)

SOCORRO,O.; GARCÍA GRANADOS,A.- *Sideritis x varoi* (Lamiaceae). Nuevo híbrido para la flora española. Trabajos del Departamento de Botánica, Universidad de Granada, 6 (1981a)

SOCORRO,O.; ESPINAR,M.C.- Sobre *Sideritis ilorcitani* Sennen. Lagasalia, 15 (extra), 319-325 (1988b)

SOCORRO,O.; MOLERO,J.; CASARES,M.; PÉREZ,F.- Algunas novedades para la flora peninsular. Trabajos del Departamento de Botánica, Universidad de Granada, 6 (1981b)

SOCORRO,O.; TARREGA,I.; ZAFRA,M.L.- Sobre algunas *Sideritis* andaluzas. *Studia Botanica*, 3, 267-271 (1984)

SOCORRO,O.; TARREGA,I.; ZAFRA,M.L.- Las secciones *Burgsdorfia* (Moench) Brig. y *Hesidia* (Moench) Bentham del Género *Sideritis* L. en Andalucía Occidental. *Lagascalia*, 14 (1), 97-100 (1986b)

STAHL,E.- TLC: A Laboratory Handbook. Springer-Verlag, Berlín (1969)

STAHL,E.- Drug Analysis by Chromatography and Microscopy, 1973

TING,S.V.; ROUSEFF,R.L.; DOUGHERTY,M.N.; ATTAWAY,J.A.- Determination of some methoxylated flavones in citrus juice by High-Performance Liquid-Chromatography. *J. of Food Science*, 44 (1), 69-71 (1979)

TOMÁS-BARBERÁN,F.A.; REJDALI,M.; HARBORNE,J.B.; HEYWOOD,V.H.- External and vacuolar Flavonoids from Ibero-North African *Sideritis* species. A chemosystematic approach. *Phytochem.* 27 (1), 165-170 (1988)

TOMÁS-LORENTE,F.; FERRERES,F.; GUIRADO,A.; TROWITZSCH,W.- Flavonas en *Sideritis leucantha* (Labiatae). *An. Quím.* 79, 96-98 (1982)

TOMÁS-LORENTE,F.;FERRERES,F.;TOMÁS-BARBERÁN,F.A.;RIVERA,D.;OBÓN,C.- Some Flavonoids and the diterpene Borjatriol from some Spanish *Sideritis* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 16 (1), 33-42 (1988)

TOMÁS-LORENTE,F.;FERRERES,F.;TOMÁS-BARBERÁN,F.A.;RIVERA,D.;OBÓN,C.- Verification of *Sideritis incana* x *S. angustifolia* hybrids by Flavonoid analysis. *Phytochem.*, 28 (8), 2141-2143 (1989)

TOMÁS,F.; FERRERES,F.; GUIRADO,A.- 5,3',4'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone from *Sideritis leucantha*. *Phytochem.* 18, 185-186 (1979)

- TOMÁS,F.; VOIRIN,B.; BARBERÁN,F.A.T.; LEBRETON,P.- Hypolaetin 8-glucoside from *Sideritis leucantha*. *Phytochem.*, 24 (7), 1617-1618 (1985)
- TOMÁS,F.; FERRERES,F.- Two flavone glycosides from *Sideritis leucantha*. *Phytochem.* 19, 2039-2040 (1980)
- TOMÁS,F.- Leucantina, nuevo flavonoide de *Sideritis leucantha*. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 19 (2), 224-228 (1978)
- TSCHIRSCH,K.; HOLZL,J.- Evidence and analytical procedure for acylated Apigenin-7-glucosides. *Pz. Wiss.*, 137 (5), 208-214 (1992)
- VAN SUMERE,C.; GEIGER,H.; BRAL,D.; FOCKENIER,G.; VANDE CASTEELE,K.; MARTENS,M.; HANSELAER,R.; GEVAER,L.- Freeze-Drying and Analysis of Plants and other Biological material. *Anal. Biochem.* 131 (2), 530-532 (1983)
- VAN SUMERE,C.;VAN BRUSSEL,W.; VANDE CASTEELE,K.; VAN ROMPREY,L.- Recent Advances in Phytochemistry, 12, 1. Ed. T. Swain, J.B. Harborne, C.F. Van Sumere, Plenum Press, Nueva York, 1979
- VENTURELA,P.; BELLINO,A.; MARINO,M.L.- A Diterpene, Distanol, from *Sideritis distans*. *Phytochem.*, 28 (7), 1976-1977 (1989)
- VILLAR,A.; ALCARAZ,M.J.- Effect of Borjatriol on Nystatin oedema. *Pharmazie*, 39, 4 (1984a)
- VILLAR,A.; ESPLUGUES,J.; ALCARAZ,M.J.- Activité pharmacodynamique de *Sideritis mugronensis*. III.- Étude de l'inflammation aigue. Activite antiulcéreuse. *Plantes médicinales et Phytothérapie*, 16 (2), 157-162 (1982a)
- VILLAR,A.; ESPLUGUES,J.; ALCARAZ,M.J.- Acute antiinflammatory activity of *Sideritis mugronensis* flavonoid. *Arch. Pharmacol. Toxicol.* 8, 99-106 (1982b)

- VILLAR,A.; GASCÓ,M.A.; ALCARAZ,M.J.- Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of Hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. J. Pharm. Pharmacol, 36, 820-823 (1984b)
- VILLAR,A.; GASCÓ,M.A.; ALCARAZ,M.J.- Effect of Hypolaetin-8-glucoside on human platelet aggregation induced by ADP. Planta medica, 455-456 (1985a)
- VILLAR,A.; GASCÓ,M.A.; ALCARAZ,M.J.; MÁÑEZ,S.; CORTÉS,D.- Hypolaetin-8-O-glucoside, an Antiinflammatory Flavonoid from *Sideritis mugronensis*. Planta medica, 1, 70 (1985b)
- VILLAR,A.; JIMÉNEZ,M.J.; ALCARAZ,M.J.- The antiinflammatory activity of the Genus *Sideritis*: a new insight. Plantes médicinales et phytothérapie, 20 (1), 31-36 (1986a)
- VILLAR,A.; JIMÉNEZ,A.; MÁÑEZ,S.- Sur la distribution des méthoxyflavones dans le Genre *Sideritis*. Plantes médicinales et phytothérapie, 19 (4), 255-261 (1985c)
- VILLAR,A.; JIMÉNEZ,A.; MÁÑEZ,S.- High-Performance Liquid-Chromatography of *Sideritis* Polymethoxyflavones. Pharmazie 40 (10), 1731 (1985d)
- VILLAR,A.; MÁÑEZ,S.; LLOPIS,A- Comparison entre trois différentes méthodes pour l'évaluation des flavonols. Ann. pharmaceutiques françaises, 42 (4), 349-351 (1984c)
- VILLAR,A.; NAVARRO,A.; ZAFRA-POLO,M.C.; RÍOS,J.L.- Constituents of the Essential Oil of *Sideritis mugronensis*. Plantes médicinales et phytothérapie, 18 (3), 150-153 (1984d)
- VILLAR,A.; RECIO,M.C.; RÍOS,J.L.; ZAFRA-POLO,M.C.- Antimicrobial activity of Essential Oils from *Sideritis* species. Pharmazie 41, 4 (1986b)
- VILLAR,A.; SALOM,R.; ALCARAZ,M.J.- Effect of Borjatriol on established adjuvant arthritis. Pharmazie, 38 (8), 566 (1983)

- VILLAR,A.; SALOM,R.; ALCARAZ,M.J.- An approach to the antiinflammatory activity of Borjatriol. *Planta medica*, 1, 116 (1984e)
- VILLAR,A.; SIMEÓN,S.; JIMÉNEZ,F.J.; RÍOS,J.L.; ZAFRA-POLO,M.C.- Screening phytochimique d'espèces de *Sideritis*. *Fitoterapia* 55 (6), 366-368 (1984f)
- VILLAR,A.; VALVERDE,S.; DE LAS HERAS,B.- A manoyl oxide Diterpenoid from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochem.*, 34 (2), 575 (1993)
- WAGNER,H.- *Plant Drug Analysis*, 1984
- WOLLENWEBER,E.; HRADEZKY,D.; MANN,K.; ROITMAN,J.N.; YAMKIEVICH,G.; PROKSCH,M.; PROKSCH,P.- Exudate Flavonoids from aerial parts of five *Ambrosia* species. *J. Plant. Physiol.* 131 (1/2), 37-44 (1987)
- WOLLENWEBER,E.; JAY,M.- Flavones and Flavonols en *The Flavonoids*, 233-296, Ed. J.B.Harborne (1988)
- ZAFRA-POLO,M.C.; BLÁZQUEZ,M.A.- Chemical constituents of the Essential Oil from *Sideritis scordioides* L. *cavanillesii* Cav. herb. *Plant. Med. Phytother.*, 23 (4), 288-292 (1989)
- ZARZUELO,A.; GARCÍA,E.; JIMÉNEZ,J.; OCETE,M.A.; UTRILLA,P.; SOCORRO,O.- Anti-inflammatory and anti-ulcerative activity of various species of the Genus *Sideritis* from the Alpujarra region of Spain. *Fitoterapia*, 64 (1), 26-30 (1993)
- ZHANG,T.; CAI,D.G.; ITO,Y.- Separations of Flavonoids and Alkaloids in medicinal herbs by High Speed Counter-Current Chromatography . *J. of Chromatog.* 435 (1), 159-166 (1988)